
LANE
MEDICAL
LIBRARY
SEAL OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY
1885
LIBRARY
Dr. Gustav Dresel

DIE METHODEN

DER

BAKTERIEN-FORSCHUNG.

HANDBUCH DER GESAMMTEN METHODEN

DER

MIKROBIOLOGIE.

VON

DR. FERDINAND HUEPPE,
Professor der Hygiene an der deutschen Universität in Prag.

Fünfte verbesserte Auflage.

MIT 2 TAFELN IN FARBENDRUCK UND 68 HOLZSCHNITTEN.

WIESBADEN.
C. W. KREIDEL'S VERLAG.
1891.

Druck von Carl Ritter in Wiesbaden.

Vorwort zur 1. und 2. Auflage.

Dem Mangel einer zusammenfassenden Darstellung über die Methoden der Bakterien-Forschung habe ich, mitbestimmt durch die Wünsche meines hochverehrten Lehrers, Herrn. Geheimrath Koch, im vorliegenden Werke zu begegnen versucht. Bei der ausserordentlich zerstreuten, zum Theil nur schwer zugänglichen Litteratur war es mein Bestreben an der Hand historischer und experimenteller Kritik das ganze Material zu sichten, das Gute aller Bestrebungen aus dem kaum noch übersehbaren Gewirre von brauchbaren und unbrauchbaren Mittheilungen herauszuarbeiten, um dem selbstständigen Forscher ein brauchbares Handbuch, dem Anfänger eine zuverlässige Einführung in das Gebiet geben zu können.

Wiesbaden, Februar 1885.

Der Verfasser.

Vorwort zur 3. Auflage.

Die methodische Forschung ist in der Bakteriologie in hohem Grade abhängig von Fortschritten der Technik. Auf der anderen Seite ist aber die technische Seite der Forschung nur ein Ausfluss der correcten methodischen Fragestellung. Jede richtig gestellte Frage hat die technische Seite der Methodik gefördert, jeder Fortschritt der Technik gestattete andere Fragen in Angriff zu nehmen. Beide Seiten der methodischen Forschung sind nicht zu trennen, wenn für Forschung und Lehre Erspriessliches geleistet werden soll.

Oft ist ein methodischer Fortschritt schwerwiegendster Art nur dadurch möglich geworden, dass man an alte, fast in Vergessenheit

gerathene Methoden anknüpfte, und eine derart entwickelte Methode empfing ihre wesentlichsten Erweiterungen und Verbesserungen bisweilen nur dadurch, dass man sie mit Methoden combinirte, welche einen ganz anderen Ursprung hatten. Es giebt keine wirklich universelle Methode; jede Methode hat ihre Schwächen und Grenzen, die dadurch nicht beseitigt werden, dass andere Methoden vielleicht noch mangelhafter sind. Eine für einen bestimmten Zweck zur Zeit beste Methode kann zur Lösung anderer Fragen vollständig im Stiche lassen.

Aus diesem Grunde hatte ich schon in der 1. Auflage versucht nicht nur die Lieblingsmethoden einer bestimmten Schule, sondern alle Methoden zu berücksichtigen. Bei diesem ersten Versuche waren Ungleichmässigkeiten schwer zu vermeiden und ich war mir dieses Mangels vollständig bewusst. Aber meiner Neigung zur synthetischen Kritik folgend war ich bemüht an der 1. Auflage selbst schärfere Kritik zu üben als sie das Werk bisher von irgend einer Seite erfahren hat. Ich hoffe auf Grund eingehender Untersuchungen derartige Ungleichmässigkeiten mehr und mehr beseitigt zu haben und war bemüht die Technik der einzelnen Methoden aus der Entwicklung der Fragestellung herzuleiten und auf der anderen Seite zu zeigen wie der jeweilige Stand der Technik seinerseits der Lösung der Fragen ein Ziel setzt und Grenzen der Methoden bedingt.

Auf diese Weise hoffe ich in der vorliegenden, noch im Erscheinungsjahre der 1. Auflage nöthig gewordenen 3. Auflage mein Versprechen am besten zu halten, das Werk für Lehre und Studium gleich zuverlässig zu gestalten.

Eine französische Bearbeitung nach der 3. Auflage durch Herrn Professor Dr. van Ermengen wird in Kürze in Paris zur Ausgabe gelangen.

Wiesbaden, November 1885.

Der Verfasser.

Vorwort zur 4. Auflage.

Die methodischen Fortschritte der letzten Jahre bestanden zum grössten Theil im Ausbau von Einzelheiten. Durch diese Ermittelungen wurde es möglich die biologischen Grundlagen der einzelnen Methoden immer besser zu erkennen. Es schien mir jedoch nicht genügend, diese neueren Ermittelungen einfach in den Plan der früheren Auflagen einzufügen, trotzdem sich die von mir zuerst durchgeführte Berücksichtigung aller Methoden für Lehren und Lernen als unerlässlich bewährt hat und trotzdem dieses Lehrbuch hierdurch zum Typus für eine Reihe von Werken über Methoden der Mikrobiologie geworden ist.

Ich habe das Werk einer vollständigen Umarbeitung unterzogen. um die einzelnen Methoden biologisch besser entwickeln und um sie auch historisch besser sichten zu können. Auf diese Weise wurde die von mir von Anfang an erstrebte Objectivität der Darstellung bei Weitem besser durchführbar. Für den Lehrer und Vorgeschrittenen hoffe ich das Werk dadurch als Hand- und Nachschlagebuch geeigneter gemacht zu haben. Da es stets und überall als eine Hauptaufgabe des naturwissenschaftlichen Unterrichts angesehen und erklärt wird, die Schüler zur Objectivität und nicht zum Autoritätsglauben zu erziehen, darf ich wohl hoffen, dass auch diese neue Auflage sich zum Unterrichte in demselben Maasse eignen wird, wie es bei den früheren Auflagen der Fall war.

Im ersten, der mikroskopischen Technik gewidmeten Theile habe ich die allgemeinen Methoden genauer mitgetheilt, weil unsere histologischen Lehrbücher hiervon meist zu wenig bringen. Die Nothwendigkeit dieser Aufnahme, trotz der zur Zeit recht schwierigen Lage der ganzen Frage, liegt in der praktischen Erfahrung begründet, dass eine Uebersicht über die allgemeinen Grundfragen die Anwendung der speciellen Methoden erleichtert, während diejenigen, welche nur nach Farbrecepten zu arbeiten gelernt haben, oft bei den einfachsten Dingen festsitzen, wenn ihr Schema einmal versagt.

Im experimentellen Theile lege ich bei den Kulturen den Schwerpunkt auf die Verdünnungsmethode, die Plattenmethode und auf die Verbindungsmöglichkeiten der einzelnen Methoden, weil die letzteren einerseits bereits jetzt alle die früher bestandenen schroffen Gegensätze der einzelnen Schulen beseitigt und damit die Kenntniss aller Methoden nothwendig gemacht haben und weil andererseits die Verbindungen der verschiedenen Methoden, bei genügender Kenntniss ihrer biologischen Grundlagen, auch am ersten die Lösung der meisten noch offenen Fragen erwarten lassen.

Die durch die Umarbeitung ermöglichten wesentlichen Verbesserungen werden mich vielleicht einigermaassen für die Verzögerung in der Herstellung der 4. Auflage dieses Lehr- und Handbuchs entschuldigen, dessen 3. Auflage seit mehr als einem halben Jahre im Buchhandel vergriffen ist.

Wiesbaden, October 1888.

Der Verfasser.

Vorwort zur 5. Auflage.

Nachdem ich bei Gelegenheit der 4. Auflage eine vollständige Umarbeitung der „Methoden der Bakterienforschung" durchgeführt hatte, war ich bemüht in der vorliegenden 5. Auflage die einzelnen Kapitel einer gründlichen Durchsicht und theilweise einer durchgreifenden Umarbeitung zu unterziehen. Besonders werden auch die Methoden zum Nachweise der neben den Bakterien immer wichtiger werdenden übrigen Mikroorganismen eingehender berücksichtigt, so dass dieses Handbuch die gesammten Methoden der Mikrobiologie enthält.

Nachdem sich das Werk von der 1. Auflage an als Lehr- und Handbuch bewährt und nachdem es als Vorlage für viele Werke über Methodik gedient hat, hoffe ich, dass sich auch diese Auflage bei der durch strenge historische und sachliche Kritik angestrebten und immer besser erreichten Objectivität der Darstellung für Unterricht und Forschung in Bakteriologie und Mikrobiologie bewähren möge.

Prag, Februar 1891.

Der Verfasser.

Inhalts-Uebersicht.

Einleitung.

Bei der ausserordentlichen Kleinheit derjenigen Organismen, welche man seit Leeuwenhoek's Entdeckung der Infusionsthierchen, 1675, mehr und mehr bei Zersetzungsvorgängen und Krankheiten beobachten lernte, wurde eine besondere Technik immer mehr nothwendig. Die methodische Forschung und die Erkenntniss auf dem Gebiete der kleinsten Lebewesen wuchs mit der technischen Seite der Methodik und umgekehrt führte das bessere Erkennen zu immer neuen Fortschritten der Technik, welche sich in Vervollkommnung und in der Regel auch allmählich in Vereinfachungen der Technicismen äusserten.

In der ersten Periode, welche auch jetzt noch nicht vollständig abgeschlossen ist, liefen zwei Fragen nebeneinander her. Die Beobachtung, dass bei Zersetzungen und Krankheiten Mikrobien auftraten, wurde so gedeutet, dass dieselben die Folge dieser Processe sind. Dies führte zu der Lehre von der Urzeugung, Abiogenesis, generatio spontanea, nach welcher Lebewesen aus unorganisirter Materie und selbst aus anorganischen Substanzen entstehen sollten. Seit Spallanzani's grundlegenden Versuchen, 1776, und von Neuem seit den Experimenten von Franz Schulze 1836, Schwann 1837, Schroeder und von Dusch 1854—1861, van den Broek 1857, Pasteur seit 1857, wurden die für Urzeugung angeführten Versuche durch immer bessere Gegenbeweise widerlegt. Die Anhänger dieser Lehre mussten sich immer mehr zurückziehen und die ursprüngliche Abiogenesis nahm die Form der Mikrozymen-Theorie von Béchamp, der Lehre von der Anamorphose des Protoplasma

von Wigand oder der Heterogenese von Fokker an, deren Lehren bis jetzt nicht bewiesen sind und, soweit vielleicht ein lebensfähiges Element darin steckt, auf falschen Deutungen der Zellelemente und deren Functionen beruhen.

Das positive Ergebniss dieser Kämpfe ist der Besitz unserer Sterilisationstechnik, welche uns einen einwandsfreien Ausgangspunkt zu gewinnen lehrt.

Die Thatsache der Existenz von Mikroorganismen genügte weiter, um ohne Rücksicht auf die einstige oder theoretisch noch annehmbare Entstehung aus unbelebter Materie, zu fragen, ob sich diese kleinsten Lebewesen nach den Gesichtspunkten der allgemeinen Systematik in Gattungen und Arten gliedern lassen. Derartige grundlegende Versuche wurden von Ehrenberg 1838 und Dujardin 1841, später besonders von F. Cohn seit 1870 ausgeführt. An die letzteren lehnen sich die neueren Bemühungen von J. Schröter, Zopf, van Tieghem, Flügge, de Bary und mir an.

Unmittelbar an diese Auffassung von der Specificität der Mikroorganismen im morphologischen Sinne schloss sich die Entwickelung der Lehre, dass die Mikroorganismen sich nicht zufällig bei Zersetzungen und Krankheiten als deren Folge einstellen, sondern dass sie durch ihre specifische Lebensthätigkeit gerade umgekehrt die Erreger dieser Processe sind.

Dies hatte schon 1813 Astier für die Hefe angenommen, aber erst Cagniard Latour und Schwann brachten unabhängig von einander gleichzeitig 1837 gute Experimentalbeweise für diese Ansicht, welche schon 1837 von Turpin zu einer allgemeinen Theorie der Zersetzungsvorgänge verallgemeinert wurde. Grundlegend wurden später besonders die Versuche von Mitscherlich, F. Cohn, J. Schröter und Pasteur.

Für die Erregung von Infectionskrankheiten wurde von Henle und Eisenmann ganz allgemein die Lehre aufgestellt, dass dieselben durch Mikrobien bedingt würden und zwar nach Henle derart, dass der typische Entwicklungsgang dieser Mikroparasiten die Ursache des typischen Verlaufes der Seuchen sei. Dieser Gedanke war an sich nicht ganz neu, sondern bereits im vorigen Jahrhundert öfters ausgesprochen, aber von Niemanden war eine so gute, zwingende

Darstellung gegeben worden wie von Henle. Später wurde diese Ansicht von Pettenkofer zum Theil wieder aufgenommen, vor allem hat aber Klebs dieselbe zu einer Zeit vertheidigt und hoch gehalten, als die Mehrzahl der Pathologen sich derselben schroff widersetzten. Die endgültige Beweisführung gelang dann Davaine, Pasteur, R. Koch und ihren Schülern.

Diese Kämpfe haben für die Technik die Uebertragungsversuche, die Kulturmethoden und als deren höchste Leistung die Methoden der Reinkulturen gebracht.

Henle hatte schon 1840 die Möglichkeit der Kulturen von Contagien angedeutet und sie als „Pilzplantage" oder „Infusorienhecke" bezeichnet. Die ersten wirklichen Kulturversuche der Bakterien, denen aber erfolgreiche Kulturen der Pilze vorausgegangen waren, rühren von H. Hoffmann und Halier her.

In Flüssigkeiten wurden von Pasteur und Cohn brauchbare Uebertragungen gemacht und relativ reine Massenkulturen gewonnen, welche Klebs in die Form der fraktionirten Kulturen brachte.

Die Uebertragungen in Flüssigkeiten wurden dann verbessert zu den Verdünnungsmethoden, welche durch „Ein-Zell-Kulturen" wirkliche Reinkulturen lieferten. Dies gelang zuerst Lister, dann Naegeli, Fitz, Miquel, Duclaux für Gährungserreger.

Diese Forschungen wurden ergänzt durch die directen Beobachtungen der Entwickelung von Spore zu Spore, wie sie in grundlegender Weise von Prazmowski, Brefeld und, für Hefen, von Hansen durchgeführt wurden.

Während die Parasitologen für Thier- und Pflanzenkrankheiten längst eine sorgfältige Experimentirkunst ausgebildet hatten, mit der vor allem die Namen von Göze, Bremser, Siebold, van Beneden, Küchenmeister, Leuckart, Tulasne und de Bary verknüpft sind, gelang für Mikroparasiten im jetzigen Sinne zuerst Bassi und Audouin eine scharfe Beweisführung für die Muscardinekrankheit der Seidenraupen und Davaine lehrte in derselben Weise durch das Thierexperiment den Milzbrand als Bakterienkrankheit sicher von anderen Wundinfectionskrankheiten trennen. Pasteur zeigte bei den Krankheiten der Seidenwürmer schon 1865 in genauen Versuchen den Unterschied zwischen den vegetativen Formen und den

Dauerformen der Parasiten für den Modus der Infection und den Verlauf der Krankheit. Dasselbe ermittelte Koch 1876 für die Milzbrandbacillen und er legte durch das Thierexperiment 1878 weiter dar, dass es ganz verschiedene specifische Erreger von Wundinfectionskrankheiten giebt.

Diese Richtung wurde wesentlich vervollständigt durch die Technik des mikroskopischen Nachweises von Mikroparasiten, speciell von Bakterien im Gewebe und hier ist Weigert bahnbrechend geworden, an den sich dann Koch und Ehrlich anschlossen. Auf diesem speciellen Theile der Forschung ist Grundlegung und Ausbildung bis zur gegenwärtigen Höhe fast ausschliesslich deutschen Forschern vorbehalten gewesen. Diese Richtung würde aber nicht zu ihrer jetzigen Höhe haben gelangen können, wenn nicht durch Stephenson, Abbé und Zeiss die homogenen Immersionssysteme eingeführt worden wären.

Auf festem, undurchsichtigem Nährboden erzielte J. Schröter bei den Pigmentbakterien 1870 Reinkulturen, welche lange Zeit als die einwandsfreiesten gelten durften und welche seit 1880 in Koch's Händen zum Ausgang für die ergebnissreichsten modernen Kulturmethoden wurden.

Salomonsen gelang es 1876 im Blute, welches er in Kapillarröhrchen aufgenommen hatte, tadellose Reinkulturen von Fäulnissbakterien zu erhalten und zwar in einer Form, welche gleichfalls die Koch'schen Methoden vorbereiten half.

Koch führte 1881 die festen, durchsichtigen Nährböden ein. Zuerst brachten seine Objectträgerkulturen durch Koch, Gaffky und Löffler neue Aufschlüsse über die Parasiten der Wundinfectionskrankheiten, von Typhus und Diphtherie und ich konnte durch das Studium der Milchzersetzungen das Ausgangsmaterial der Gährungsphysiologie wesentlich erweitern und sichern. Koch's Plattenkulturen gipfeln im Nachweise der durch Pasteur's Methoden nicht auffindbar gewesenen Cholera-Parasiten, 1884, durch Koch selbst und haben zur Erkennung vieler Krankheits- und Gährungserreger geführt, so dass Klebs und de Bary das Princip dieser Methode als das Columbus-Ei der Methodik bezeichneten.

Die Kulturen auf festem Blutserum führten Koch 1882 zur Entdeckung des Tuberkelbacillus, einer Entdeckung, welche in methodischer Durcharbeitung nur wenige ihres Gleichen haben dürfte und als die grösste Leistung von Koch bezeichnet werden muss. Dieselbe Methode führte Löffler und Schütz zur Entdeckung der Rotzbakterien.

Wenn Löffler in seiner Geschichte der Bakteriologie im Jahre 1878 einen dicken Strich macht und von diesem Jahre eine neue Epoche datirt, so widerspricht dies dem historischen Gange der Entwickelung unseres Gebietes vollständig, da damals von Koch eine Detailarbeit geliefert wurde, welche sich bei vollster Anerkennung ihrer Einzelheiten und der Fortschritte in Technicismen, in bereits von Anderen vorgezeichneten Geleisen bewegte und welche nicht einen neuen Gedanken in die Wissenschaft einführte. Epochen in der Geschichte einer Wissenschaft werden aber nicht durch Technicismen als solche bestimmt, sondern erst durch die mit den verbesserten technischen Hülfsmitteln gewonnenen neuen Thatsachen und Ideen, welche alte Gebiete befruchten und neue erschliessen.

Nicht nur die damalige Arbeit von Koch, sondern alle bis jetzt betrachteten bewegen sich in den Bahnen, welche zuerst Henle und Turpin, dann Cohn, Klebs und vor Allen Pasteur vorgezeichnet hatten und sie gipfeln im Nachweise, dass specifische Zersetzungen und Krankheiten durch specifische Organismen erregt, veranlasst werden.

Ganz abgeschlossen wird diese Epoche erst sein, wenn wir für jede durch Organismen bedingte Zersetzung oder Krankheit den veranlassenden Organismus kennen und umgekehrt, wenn wir von jedem Organismus wissen, was er leistet. Die Erkenntnisstheorie würde aber durch solche Einzelheiten nicht mehr viel gewinnen, seit das Princip als solches über jeden Zweifel sicher gestellt ist und seit wir im Stande sind, den Beweis fast mit derselben Schärfe wie in der Physik zu führen. Als eine wirkliche Lücke muss es aber gelten, dass uns die Aetiologie der heterologen Neubildungen noch vollständig unbekannt ist, seit der Krebsbacillus als ein gewöhnlicher harmloser Saprophyt erkannt ist. Lassen sich doch bei diesen Neubildungen Gründe anführen, welche auf einen ganz anders gearteten

und nicht auf einen mikroparasitären Ursprung hinweisen, wenn auch einige Gründe für die letztere Auffassung geltend gemacht werden können! Ebenso unklar ist die Aetiologie der acuten Exantheme des Menschen, seit L. Pfeiffer in scharfer Kritik die Haltlosigkeit der bisherigen Beweise für Bakterien als Erreger der Pocken gezeigt hat. Die Bakterien, welche als Erreger des Scharlach angegeben wurden, sind nacheinander als falsche erkannt worden und die neuesten Scharlachbacillen wurden in meinem Laboratorium als gewöhnliche Saprophyten erkannt. Wahrscheinlich gehören die Parasiten der acuten Exantheme zu den amoeboiden Mikroorganismen und gar nicht zu den Bakterien.

Ein unserem erkenntniss-theoretischen Verlangen genügender Abschluss der ersten Epoche wird erst angenommen werden können, wenn uns die Aetiologie der heterologen Neubildungen und der acuten Exantheme in mindestens einem einwandsfreien Beispiele vorliegt.

Unter diesen Umständen bezeichnet die Koch'sche Methodik in ihrer Gesammtheit einen vorläufigen methodischen Abschluss in der ersten Epoche, welche auf den Nachweis specifischer Organismen gerichtet ist. Dadurch wird sie zur besten Grundlage für unser ganzes Arbeiten und sie ist der Pasteur-schen und Naegeli'schen Schule jetzt ebenso unentbehrlich wie der Koch'schen selbst. Der gesammten Koch'schen Methodik lässt sich in der ganzen modernen Medicin vielleicht nur die Ausbildung der Methoden für Muskel- und Nervenphysik durch du Bois-Reymond an die Seite stellen. Durch Koch's Methodik wurde erst die Bakteriologie popularisirt und zum Gemeingut der Aerzte.

Dass man aber auch die in Einzelheiten bis jetzt oft weniger exacte ältere, biologisch aber universeller angelegte Methodik der Pasteur'schen und Naegeli'schen Richtung wieder mehr beachten muss, als es bei uns in den letzten Jahren vielfach in der Freude über die bestechende Einfachheit der Koch'schen Methodik geschehen ist, lehrt unwiderleglich die Thatsache, dass Koch's Methoden für einige der wichtigsten Fragen, z. B. Aetiologie der acuten Exantheme und der heterologen Neubildungen, im Stiche lassen und dass die **zweite** und wirklich neueste **Epoche** in der Bakteriologie sich sogar

im schroffen Gegensatze zu Koch's Methodik und zum grundlegenden Gedanken der ersten Epoche entwickelt hat.

Als Vorläufer dieser zweiten Epoche müssen die Anhänger der Lehre von der Urzeugung insofern gelten, als sie sich immer gegen die Lehre von der Specificität und Constanz der Mikroorganismen nach Form und Wirkung ausgesprochen hatten. Perty that dies zuerst vom morphologischen Standpunkte in vorsichtiger Weise schon 1852; später verallgemeinerte Hallier diese Ansicht in's Ungemessene; H. Hoffmann, Trécul, Ray-Lankester, Billroth, Naegeli schlossen sich diesem Gedankengange an.

Als Vorgänger müssen auch Coze und Feltz angesehen werden, welche 1866 die Lehre von der progressiven Virulenz krankheitserregender Bakterien entwickelten. Mit Rücksicht auf die Art, wie die zweite Periode in die Erscheinung trat, müssen auch die Experimentatoren über Schutzimpfungen seit Jenner zum Theil hierher gerechnet werden. Schon 1878 hatte H. Buchner nachgewiesen, dass pathogene Bakterien und zwar die Milzbrandbacillen durch biologische Eingriffe derart beeinflusst werden können, dass sie schliesslich ihre Virulenz verlieren. Diese Versuche waren aus einem klaren, naturwissenschaftlichen Gedankengange herausgewachsen und systematisch in Angriff genommen worden. 1880 konnte H. Buchner diese Versuche noch erweitern und gleichzeitig machte Pasteur zufällig dieselbe Beobachtung an den Bakterien der Hühnercholera, so dass wir das Jahr 1880 als das wichtigste für die zweite Epoche bezeichnen müssen. Die Versuche, welche Buchner gleichzeitig über weitgehende morphologische Umzüchtungen und über den umgekehrten Vorgang, die Zunahme resp. Anzüchtung der Virulenz beibrachte, haben dagegen der Kritik nicht Stand gehalten, doch gelang es später Pasteur zu zeigen, dass im engeren Rahmen auch eine Zunahme der Virulenz erfolgen kann und die neueren und neuesten Versuche lassen an der Thatsache, dass sich die morphologischen und physiologischen Eigenschaften in gewissen, nach den Species schwankenden Graden verändern können, keinen Zweifel.

Das waren neue, grundlegende, einwandsfreie Thatsachen, welche alte Ideen, die früher noch nicht experimentell

bearbeitet werden konnten, auch dem experimentellen Bearbeiten zugänglich machten und welche neue Anschauungen zu fassen gestatteten; welche durch alles dies so anregend wirkten, wie keine Entdeckung vorher.

Zunächst hat Pasteur selbst gezeigt, dass die Kulturen mit geringerer Virulenz eine Schutzimpfung gegen die virulenten Stammkulturen gestatten und in dieser Hinsicht dreht sich der Streit nicht mehr um die völlig gesicherte Thatsache, sondern darum, für welche Krankheiten dies nachweisbar ist und ob und in wie weit darauf eine praktische Bekämpfung der Infectionskrankheiten aufgebaut werden kann.

Für Krankheiten mit langsamem Verlaufe wurde unter Pasteur's Händen die Schutzimpfung zur Heilimpfung, die Schutzlymphe zum Heilmittel, zuerst für die Hundswuth, in letzter Zeit durch Koch für die Tuberkulose.

Chauveau und Toussaint brachten seit 1881 gute Wahrscheinlichkeitsbeweise und Salmon und Smith 1886 und später besonders Roux und Chamberland auch directe Beweise, dass man durch sterilisirte Stoffwechselproducte einen Impfschutz gegen virulente Infectionserreger erzielen kann. Durch diese physiologisch-chemischen Arbeiten und durch die Phagocytenlehre von Metschnikoff ist ein Weg angebahnt, auf dem es wohl in absehbarer Zeit gelingen dürfte, über das Wesen der individuellen Disposition positive, experimentell beweisbare Aufschlüsse zu bekommen.

Die morphologische Forschung wurde dadurch beeinflusst, dass sich ergab, dass je nach den gewählten Mitteln eine Degeneration der Art erfolgt, welche Flügge in letzter Zeit stark betont, dass aber auch umgekehrt lebenskräftige und kräftigere Generationen erzielt werden können, welche wirklich neue Modificationen und Varietäten bilden, wie es Buchner zuerst in ungenügender Weise, dann aber Prazmowski und de Bary in sicherer Weise ermittelten, und ich zeigte, dass für die Entstehung einer neuen, kräftigen Varietät die Isolirung in Reinkulturen die unerlässliche Vorbedingung ist, so dass derartige Varietäten den Werth von Standortsvarietäten gewinnen. Wir sind dadurch in den Stand gesetzt, über die Isolirung als artbildenden Factor, wie sie von L. von Buch

und Moritz Wagner erkannt worden ist, directe Experimentalbeweise zu liefern.

In physiologischer Hinsicht lässt sich mehr und mehr erkennen, dass der allgemeine Stoffwechsel der saprophytischen und krankheitserregenden Bakterien gleichgerichtet ist. Ich zeigte, dass die Entzymwirkung der Bakterien als eine abgeleitete Function, als eine Anpassung an die Ernährung aufgefasst werden muss und dass sie als nicht ursprüngliches Artmerkmal in der Regel experimentell beeinflusst werden kann, während wirkliche Artmerkmale constant und unseren Einflüssen unzugänglich sind. Die ursprüngliche Ernährung der Bakterien ist eine intrazellulare. Die primären Spaltungen und Synthesen müssen sich deshalb im Protoplasma vollziehen und müssen im Principe unabhängig sein von An- oder Abwesenheit von Luftsauerstoff. Nicht für die anaerobiotischen Gährungen muss, wie es Pasteur aussprach, die Abwesenheit der Luft causal sein, sondern jeder Zelle muss bis zu einem gewissen Grade die Fähigkeit zukommen, ohne Rücksicht auf An- oder Abwesenheit von Sauerstoff Wärme liefernde Spaltungen, aber auch Wärme consumirende Synthesen auszuführen.

Dass besonders gewisse basische Stoffwechselproducte, Ptomaine, Toxine, ebenso gut von saprophytischen wie von pathogenen Bakterien gebildet werden, haben Nencki, Selmi, Gauthier und am genauesten Brieger bewiesen. Neben diesen Basen und dieselben an Bedeutung weit überragend haben sich in den letzten Jahren die primären Spaltungsproducte der Eiweisskörper als Toxalbumine erwiesen, welche bis jetzt sicher unter den Globulinen, Albumosen und Peptonen gefunden werden. Unter diesen Körpern finden sich sowohl die specifischen Gifte als die Impf-Schutz und Heilung bringenden Körper. Durch Isolirung derselben gestalteten sich die Schutz- und Heilimpfungen sicherer und relativ gefahrloser, weil das Mitübertragen der Parasiten ausgeschlossen wird, welches bei den ursprünglichen Pasteur'schen Impfungen ein oft grosser Uebelstand war.

Pringsheim hatte schon vor mehreren Jahren gezeigt, dass die rein chemische Deutung der Chlorophyllwirkung ungenügend ist und durch eine physikalische ersetzt werden muss, Engelmann hatte die physikalischen Beziehungen verschiedener Chromophylle

erkannt und Heraeus und ich haben ermittelt, dass eine weder Chlorophyll noch andere Chromophylle enthaltende Bakterienart den Kohlenstoff der Kohlensäure assimiliren kann, so dass diese bis jetzt aufrecht erhaltene physiologische Schranke zwischen Thier- und Planzenzellen aufgegeben werden muss. Diese selbe Bakterienart vermochte aber auch gleichzeitig eine Oxydationsgährung auszuüben, nämlich Ammoniak zu Salpetersäure zu oxydiren. Diese Thatsache des Aufbaues organischer Materie aus kohlensaurem Ammoniak wurde später auch von Winogrodsky bestätigt, wenn auch theilweise anders gedeutet. Ich habe dabei zuerst die sich sonst in schroffster Form entgegen gesetzt verhaltenden Wirkungen der Reduction und Oxydation in ein und derselben Zelle nachgewiesen und damit eine Anknüpfung an Beobachtungen gefunden, die zuerst von M. Traube für Gährungen gemacht worden waren. Die von der Anwesenheit von Licht unabhängigen und die davon abhängigen Pigmentbildungen bei Bakterien gestatten uns neue Anhaltspunkte über die Phylogenese des Chlorophylls und anderer Chromophylle aus nicht an das Licht angepassten Stoffwechselproducten zu gewinnen.

Damit sind Verknüpfungen zu physiologischen Erfahrungen über Stoff- und Kraftwechsel der Zellen gewonnen, welche zuerst wohl von R. Virchow richtig beachtet, später von R. Mayer, Liebig, Pasteur, Hoppe-Seyler, Nencki, am besten aber von Cl. Bernard und Pflüger erkannt wurden. Alles dieses enthält die Grundzüge einer ächten Zellularphysiologie, bei deren weiterer Ausarbeitung der Bakteriologie in Folge der durchsichtigen und einfachen Experimente, eine wichtige Rolle gewahrt bleiben dürfte und bei der ich als erste leitende Gesetzmässigkeit dargelegt habe: „dass auch auf dem Gebiete der Differenzirung der Functionen nur kleine quantitative Steigerungen nach der einen oder anderen Richtung schliesslich zu weitgehenden qualitativen Differenzen führen können.“ Für das Verständniss dieser Möglichkeit ist es wichig, dass sich die Bakterien auch morphologisch viel complicirter zusammengesetzt erweisen, als man früher annahm. Ich konnte 1886 die Kernnatur der sog. Protoplasma der Bakterien wahrscheinlich machen und Bütschli hat 1890 gezeigt, dass der grösste Theil,

bei den kleinen Formen scheinbar der ganze Inhalt, als Kern aufzufassen ist, der von einem, dem Protoplasma homologen Mantel eingehüllt ist, aus dem sich die Membran differenzirt.

Manche Bakterien vermögen nach unserem jetzigen Wissen nur eine Wirkungsart auszuüben, andere dagegen entfalten je nach dem Medium engere oder weitere „Wirkungscyklen“ und einzelne Arten können event. sogar typische Gährungen erregen, stinkende Fäulniss bewirken, Pigmente bilden, für einzelne Thiere toxisch und für andere infectiös sein. In letzter Zeit ist es mir gelungen, durch Verwendung von Schutzimpfungen als Mittel zum Zweck phylogenetische Beziehungen zwischen exquisit nichtpathogenen und exquisit infectiösen Bakterien experimentell zu beweisen, was später auch von Chauveau in anderer Versuchsanordnung erkannt wurde. Ich konnte deshalb neben der ersten Gesetzmässigkeit noch eine zweite Gesetzmässigkeit begründen, welche ich so fasste: „für viele Fälle deckt sich demnach Fäulnissursache und Infectionsursache vollständig“ und aus beiden ergiebt sich ein drittes Gesetz: „dass auch phyletisch die Grenze zwischen Intoxication durch Fäulnissgifte und der Infection gefallen ist, dass die phyletische Quelle aller Infectionen in den Fäulnissprocessen liegt“, was früher von Naegeli und Pasteur bereits vermuthet worden war. Damit hat das älteste Problem der Aetiologie zum ersten Male eine inductive Begründung erfahren.

Neben dieser Erkenntniss über ontogenetische und phylogenetische Beziehungen zwischen saprophytischen und krankheitserregenden Bakterien, welche auf dem Gebiete der allgemeinen Biologie gewonnen wurden und ohne die Entdeckung von H. Buchner und Pasteur experimentell nicht hätten begründet werden können, hat die Pathologie noch andere Beziehungen der Bakterien zu den Säften und Zellen des Körperszu lösen. Die besonders von Klebs und Koch vertretene Auffassung, dass die Bakterien die „Ursache“ der Krankheiten sind, hatte zu einem vollständigen Verkennen der erkenntnisstheoretischen Seite und damit zunächst zu einem naturwissenschaftlichen Rückschritte geführt. Da eine „Ursache“ selbstverständlich alles ihrem Bereiche Zugängliche bewirken muss, so entstand die falsche Auffassung, dass

die Bakterien allein für den Verlauf der Krankheit verantwortlich sind, dass man aus der Kenntniss der Biologie der Bakterien die Krankheiten construiren kann. Die Bakterien und andere Mikrobien sind aber nur die Erreger, der Anstoss, die Auslösung, während die eigentlichen Ursachen in naturwissenschaftlichem Sinne in den gährfähigen Substanzen und in den Geweben liegt. Der Erfolg des Anstosses hängt demnach nicht allein von der Natur der Erreger ab, sondern ebenso gut von der Natur der erregten Substanz und von den Bedingungen, unter denen der Anstoss die Substanz trifft. Die Kenntniss des Nährbodens, der gährfähigen Substanzen und der Gewebe, Zellen und Säfte, ist demnach ebenso nothwendig, wie die Kenntniss der Bakterien und mit dem Studium dieser Dinge sind die alten Begriffe der Disposition und Immunität wieder zu ihrem Rechte gekommen. In der bestimmten Hervorhebung dieses Verhältnisses der Mikrobien innerhalb der Causalität liegt allein die Möglichkeit, einseitige und falsche Vorstellungen über die Aetiologie, über die Mikrobien als „Ursache" zu vermeiden und zu einer erkenntnisstheoretisch befriedigenden, d. h. streng naturwissenschaftlichen Auffassung und damit zu einer wirklichen Theorie der Gährungen und Infectionskrankheiten zu gelangen, wie es von J. R. Mayer, Naegeli und mir ausgeführt worden ist.

Virchow's Warnung, die Zellen nicht über den Bakterien zu vergessen, war deshalb ein Wort zur rechten Zeit. Koch's Nachweis von Bakterien in Zellen eröffnete für die Bakteriologie die positiven Ermittelungen auf diesem Gebiete, während für andere Mikroorganismen solche Dinge längst bekannt waren. K. Roser machte 1881 auf den relativen Salzgehalt der Körpersäfte und auf die Fähigkeit der contractilen Zellen, die eindringenden kleinen Feinde in sich aufzunehmen, aufmerksam und schliesslich stellte Metschnikoff 1883 die so überaus wichtige und anregende Lehre von der Phagocytose auf, durch welche die mit dem Abbé'schen Beleuchtungsapparate aus dem Gesichtsfelde und auch aus dem Gedächtnisse vieler fast beseitigten Zellen wieder in ihr altes Recht eingesetzt wurden. Wie auch in Einzelheiten dieser Kampf für die Zellen (Metschnikoff) oder für die Säfte (Baumgarten, Weigert, Flügge) entschieden werden mag, die Zellular-Physiologie und

Pathologie wird auf jeden Fall der Bakteriologie hierbei manchen Fortschritt verdanken.

Bei dieser Ausdehnung des Gebietes und seinen vielen Beziehungen zu scheinbar heterogenen Nachbargebieten, die nur durch allgemein biologische Probleme unter einander verbunden sind, ist es schwer dem Unterrichte in der Bakteriologie die richtige Gestalt zu geben. An der Forschung in Bakteriologie und Mikrobiologie müssen sich Physiologen und Pathologen, Hygieniker und Chemiker, Zoologen und Botaniker betheiligen und ihren speciellen Antheil auch im Unterrichte vortragen. Aber dies genügt schon lange nicht mehr für das Bedürfniss des medicinischen Unterrichts. Specielle Lehrstühle für Mikrobiologie sind nicht überall zu beschaffen und ihre würdige Stellung dürfte so wie so noch für lange an der specifischen Eigenthümlichkeit des lehrenden Theiles des Gelehrtenstandes scheitern, sich jeder neuen Disciplin möglichst lange zu widersetzen und ihr erst Gleichberechtigung zu gewähren, wenn die Fortschritte der Wissenschaft jeden derartigen Widerstand brechen.

Unter diesen Umständen ist als Regel für den Unterricht in der Mikrobiologie und Bakteriologie eine Verbindung mit einem anderen Fache vorläufig noch der bessere Ausweg. Da die gewaltigen Fortschritte der Bakteriologie in allererster Linie durch die Bedürfnisse der Hygiene, durch die Forschungen über Aetiologie und Bekämpfung der Infectionskrankheiten bedingt wurden, scheint mir immer noch die Verbindung mit der Hygiene die geeignetste. Dass die Hygiene nicht in der Bakteriologie aufgehen darf und dass sie noch viele von der Mikrobiologie unabhängige Aufgaben zu lösen hat, habe ich unter den Bakteriologen als erster vertreten und diese Auffassung, welche mir zuerst sehr übel genommen worden war, dürfte wohl jetzt keinem ernstlichen Widerspruche mehr begegnen, seit auch Koch und Flügge sich im Vorworte zu ihrer Zeitschrift zu derselben bekannt haben.

Wo kein geeigneter Hygieniker vorhanden ist, könnte auch die Vereinigung mit der Pathologie empfohlen werden. Allgemein möchte ich dies aber nicht als das Bessere bezeichnen, da die stiefmütterliche Art und Weise, wie in der Regel allgemeine Pathologie oder pathologische Physiologie als Anhängsel der pathologischen Anatomie

behandelt werden, die allgemeine Aetiologie nicht so ausreichend berücksichtigt, wie dies jetzt dringend gefordert werden muss.

Die gewöhnlichen Unterrichtskurse, wie sie unter der Form der Berliner Cholerakurse ganz populär geworden sind, können natürlich Niemanden zum Bakteriologen machen und Choleradiagnosen, denen keine weitere Uebung zu Grunde liegt, werden wohl nicht ohne Weiteres als beweisende zu betrachten sein. Aber dies kann auch unmöglich der Hauptzweck des Unterrichts sein. Wie seit einigen Jahrzehnten die landläufigen Urinuntersuchungen manchen Mediciner, der sich sonst nie auf dieses Gebiet begeben hätte, veranlasst haben sich eingehender mit physiologischer Chemie und den Fragen des Stoffwechsels und der Diätetik zu befassen, so hoffe ich von den kurzen bakteriologischen Kursen in erster Linie, dass sie unsere jungen Mediciner zum Nachdenken und zur dauernden Beschäftigung mit der Aetiologie der Krankheiten anregen. Dann erst können wir erwarten, dass eine hygienische Therapie unseren Aerzten in Fleisch und Blut übergeht und die prophylaktische Bekämpfung der Krankheiten auf eine höhere Stufe kommt.

Litteratur zur Geschichte.

Ehrenberg: Die Infusionsthierchen als vollkommene Organismen. 1838. Für die ältere Litteratur das Hauptwerk.

Kopp: Geschichte der Chemie. 1843—47. Für die ältere Litteratur der Gährungen unerlässlich.

Ad. Mayer: Lehrbuch der Gährungs-Chemie. 3. Aufl. 1879. Kurze Geschichte der Fermentationen.

Hueppe: Zur Geschichte der Milchsäuregährung. Mittheilungen a. d. K. Gesundheitsamte. 1884. Bd. II, S. 307. Historische Kritik der Gährungsphysiologie.

Hueppe: Die Formen der Bakterien. 1886. Kurze kritische Geschichte der Formfrage.

Löffler: Vorlesungen über die geschichtliche Entwickelung der Lehre von den Bakterien. 1887. Das Koch zu Liebe als Ende der Epoche angesetzte Jahr 1878 bezeichnet gar keine wirkliche Epoche in der Bakteriologie. Ausserdem ignorirt Löffler seine Vorgänger vollständig, trotzdem er deren Arbeiten verwerthen musste. Hiervon abgesehen ist das sehr vollständige und zuverlässige Werk nur dringend zum Studium zu empfehlen.

Laufende Litteratur.

Baumgarten: Jahresbericht über die Fortschritte in der Lehre von den pathogenen Mikroorganismen. Erscheint seit 1886 und ist unentbehrlich.

Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde. Von Uhlworm, Leuckart, Löffler.

Gelegentliche Arbeiten enthalten fast alle medicinischen . und biologischen Zeitschriften. Eingehender befassen sich mit diesem Gegenstande:

Annales de l'Institut Pasteur. Von Duclaux.
Annales de Micrographie. Von Miquel.
Archiv für Hygiene. Von Pettenkofer.
Archiv für pathologische Anatomie. Von Virchow.
Beiträge zur pathologischen Anatomie. Von Ziegler.
Fortschritte der Medicin. Von Eberth und Curschmann.
Zeitschrift für Hygiene. Von Koch und Flügge.
Zeitschrift für Mikroskopie. Von Behrens.

I. Die Mikroskopische Technik.

1. Die Formen der Mikroorganismen.

Litteratur zur allgemeinen Orientirung und speciell über Morphologie.

Bakterien.

F. Cohn und J. Schröter in den Beiträgen zur Biologie der Pflanzen; seit 1870.
de Bary: Vorlesungen über Bakterien. 2. Aufl. 1887.
Baumgarten: Lehrbuch der pathologischen Mykologie. 1886 ff.
Bütschli: Ueber den Bau der Bakterien. 1890.
Cornil et Babes: Les Bacteries. 3. Aufl. 1890.
Crookshank: An Introduction to practical Bacteriology. 1886.
Duclaux: Ferments et Maladies. 1883.
Duclaux: Le Microbe et la Maladie. 1886.
Flügge: Die Mikroorganismen. 2. Aufl. 1886.
C. Fränkel: Grundriss der Bakterienkunde. 3. Aufl. 1890.
C. Fränkel und R. Pfeiffer: Mikrophotographischer Atlas der Bakterienkunde. 1889 ff.
Eisenberg: Bakteriologische Diagnostik. 2. Aufl. 1888.
Hueppe: Die Formen der Bakterien. 1886.
Klein: Micro-Organisms and Disease. 3. Aufl. 1886.
Naegeli: Die niederen Pilze. 1877.
Naegeli und Buchner: Untersuchungen über niedere Pilze. 1882.
Zopf: Die Spaltpilze. 3. Aufl. 1885.

Pilze und verwandte Mikroorganismen.

de Bary: Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze. 1884.
Brefeld: Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze. I bis VII 1872 bis 1888.
Joergensen: Die Mikroorganismen der Gährungsindustrie. 2. Aufl. 1890.
Leunis-Frank: Synopsis der Pflanzenkunde. III. 1882/83: Kryptogamen.
Ad. Mayer: Lehrbuch der Agrikulturchemie. 1886.
Ad. Mayer: Lehrbuch der Gährungschemie. 3. Aufl. 1878.
J. Schröter: Abschnitte, Pilze und Bakterien in Cohn's Kryptogamenflora von Schlesien. III. 1885.
Van Tieghem: Traité de botanique. 1883.
Zopf: Die Pilze. 1890.

Amoeboide, Mikroorganismen, Myzetozoen, Flagellaten, Sporozoen, Psorospermien, Gregarinen.

Balbiani: Leçons sur les sporozoaires. 1884.
Bütschli: Bronn's Classen und Ordnungen des Thierreichs. I. 1882.
Maggi: Protisti e Malattie. 1882.
L. Pfeiffer: Die Protozoen als Krankheitserreger. 1890.
Zopf: Die Pilzthiere oder Schleimpilze. 1885.

Parasiten.

Braun: Die thierischen Parasiten des Menschen. 1885.
Frank: Die Krankheiten der Pflanzen. 1880.
Leuckart: Die Parasiten des Menschen. 2. Aufl. 1881.

Allgemeines über wichtigere Arten und Formen von Mikroorganismen.

Eyferth: Die mikroskopischen Süsswasserbewohner. 2. Aufl. 1885.
Kirchner und Blochmann: Die mikroskopische Pflanzen- und Thierwelt des Süsswassers. 1886.
de Vries: Die Pflanzen und Thiere in den dunklen Räumen der Rotterdamer Wasserleitung. 1890.

Beziehungen zu Zellelementen und zur Generatio spontanea.

Altmann: Studien über die Zelle. I. 1886. Die Elementarorganismen. 1890.
Béchamp: Les Microzymas. 1883.
Estor: De la constitution élémentaire des tissus. 1882.
Fokker: Untersuchungen über Heterogenese. 1. bis 3. Heft. 1887/88.
Wigand-Dennert: Das Protoplasma als Fermentorganismus. 1888.
Als Unterrichtsmittel: Wandtafeln von Migula und von Eberth (beide im Erscheinen begriffen).

Der mikroskopische Nachweis der Mikroorganismen setzt in erster Linie eine Kenntniss der Formen voraus. An den verschiedenartigen, leichter zugänglichen Formen und Arten muss die Technik des mikroskopischen Nachweises so allgemein ausgebildet und erlernt werden, dass mit diesen Hülfsmitteln auch die noch unbekannten Formen und Arten ermittelt werden können. Besonders schwierig wird der mikroskopische Nachweis, wenn sich kleinste Formen im Pflanzen- und Thiergewebe als Parasiten finden, weil in diesen Fällen die Kleinheit der Formen nicht die einzige Schwierigkeit bildet, sondern weil sich in den Geweben ausserdem normale Formelemente finden, welche zu Verwechselungen mit Mikroorganismen führen können und auch schon oft geführt haben. Durch Verbesserungen der Technik wurde es mehr und mehr möglich nachzuweisen, dass auch die kleinsten Mikroorganismen in legitimer Folge aus ihres-

gleichen hervorgehen, dass bei ihnen die Artfrage eben so gut zu Rechte besteht, wie bei leichter erkennbaren Mikroorganismen, bei denen jetzt kein Naturforscher mehr ernstlich an irgend eine Art der generatio spontanea auch nur denkt.

Dass aber die Frage nach der Möglichkeit der Entstehung der kleinsten Bakterienformen aus normalen Gewebselementen durch eine Anamorphose des Protoplasma oder seiner Granula immer wieder auftaucht, zeigt, wie vorsichtig man auf diesem Gebiete vorgehen muss und wie durchaus nothwendig eine Vertrautheit mit den kleinsten Formelementen überhaupt ist. Bis jetzt hat die Beweisführung derer, welche für eine Entstehung von Mikroorganismen durch Anamorphose des Protoplasma, also für eine modificirte Urzeugung eintraten, immer viel zu wünschen übrig gelassen und die Anhänger dieser Ansicht flüchteten sich erst von der groben generatio spontanea zur Anamorphose des Protoplasma und in der so eingeschränkten Lehre von kleinen zu immer kleineren und kleinsten Formelementen.

Die mikroskopische Technik musste in diesem Kampfe zuerst die Bakterien genauer beachten und hat sich gerade an diesen Lebewesen so entwickelt, dass praktisch der Nachweis der Bakterien zur Zeit noch im Vordergrunde steht. Doch haben die parasitologischen Erfahrungen der letzten Zeit schon ausreichend neue Schwierigkeiten gezeigt, insofern man schon jetzt mehr und mehr gezwungen wird, amoeboide Mikroorganismen, welche den Myzetozoen, Flagellaten und anderen Gruppen zugehören, zu beachten und gerade hierbei sind wieder neue technische Schwierigkeiten zu überwinden.

Ueber die Bakterien möchte ich eine kurze Orientirung vorausschicken, weil zwischen den wissenschaftlichen Morphologen und vielen praktischen Medicinern auch über die einfachsten Formfragen kaum eine Verständigung möglich erscheint. Cohn hatte, dem Gebrauche der Systematik folgend, zuerst die Bakterien in Gattungen einzutheilen versucht, indem er alle ihm bekannten Form- und Entwickelungsmerkmale verwerthete. Die Namen: Mikrokokkus, Bakterium, Bacillus, Spirillum etc. bezeichnen bei ihm, den Gesetzen der generellen Morphologie entsprechend, nur Gattungen und keine einfachen Formen und zur Charakterisirung jeder Gattung gehören eine Anzahl Formen und Kenntniss des Entwicklungsganges der Formen.

Dem gegenüber haben sich gerade die Mediciner vielfach aus Bequemlichkeit gewöhnt, diese Gattungsnamen einfach als Formnamen aufzufassen und so die Formfrage mit der Frage nach den Gattungen und Arten durcheinander zu werfen. Die natürliche Consequenz dieses Durcheinanderwerfens verschiedenartiger Dinge ist, dass man jetzt vielfach die Gattungen und Arten nach einer einzigen Form bestimmt und den Werth dieser Form mit Zirkel und Lineal statt nach morphologischen und genetischen Gesichtspunkten ermittelt.

Nun sind aber thatsächlich alle Formen durch alle möglichen Uebergangsformen mit einander verbunden und trotzdem sind wir im Stande, Gattungen und Arten auseinander zu halten. Jede einzelne Form ändert sich nach den Phasen der Entwickelung. Eine Kugel streckt sich und wird zum Ellipsoid, ein Langsstäbchen theilt sich und wird zum Kurzstäbchen, ein Kurzstäbchen zerfällt in zwei Ellipsoide oder Kugeln. Wann man ein Zellchen noch als Ellipsoid oder schon als Kurzstäbchen mit abgerundeten Enden bezeichnen soll, wann als Ellipsoid oder schon als Spindelstäbchen, wird immer mehr oder weniger Geschmackssache bleiben. Ein gekrümmtes Stäbchen ist durch die Form der kleinsten Zellen nicht sicher und nicht immer von einem Schraubenstäbchen zu unterscheiden. Vor der Theilung strecken sich in der Regel die Einzelzellen deutlich, sie werden grösser und es treten dadurch schärfere Formen auf: kuglige Zellen werden zu Ellipsoiden, Ellipsoide zu Stäbchen, undeutliche Schraubenstäbchen zu charakteristischen Schrauben. Umgekehrt werden durch die erfolgende Theilung längere und deutlichere Formen kleiner und undeutlicher.

Hierzu kommt, dass viele Bakterien je nach dem Nährboden Formschwankungen zeigen, welche diese feinen Grenzen noch mehr verwischen. Eine Schwierigkeit entsteht daraus aber nur für diejenigen, welche die Arten durch Abzirkeln einer Form bestimmen wollen oder die jedesmal längste und grösste Form ohne Weiteres für die maassgebende ansehen. Da in besonders deutlichen Fällen bestimmte Formen in gewissen Entwickelungsstadien typisch wiederkehren, entspricht es dem praktischen Bedürfnisse, die Formen in einige einfachere Gruppen unterzubringen, besonders auch deshalb, weil die Einzelzellen, gerade wenn sie ihre lebhafteste Thätigkeit

entfalten, im vegetativen Stadium, in solchen mehr typischen Formen aufzutreten pflegen. Am besten ist es, diese Formen als Wuchsformen zu beschreiben und nicht mit besonderen Namen

Fig. 1.



Zum Theil nach Koch und Prazmowski.

zu belegen, weil diese Namen für die Gattungen bereits längst vergeben sind. Ich unterscheide mit de Bary drei Formgruppen der Einzelzellen:

a) Kokkenformen (nicht: Mikrokokkus!) umfassen kugelige, Fig. 1 (1, 3—5), und ellipsoide Zellen (2).

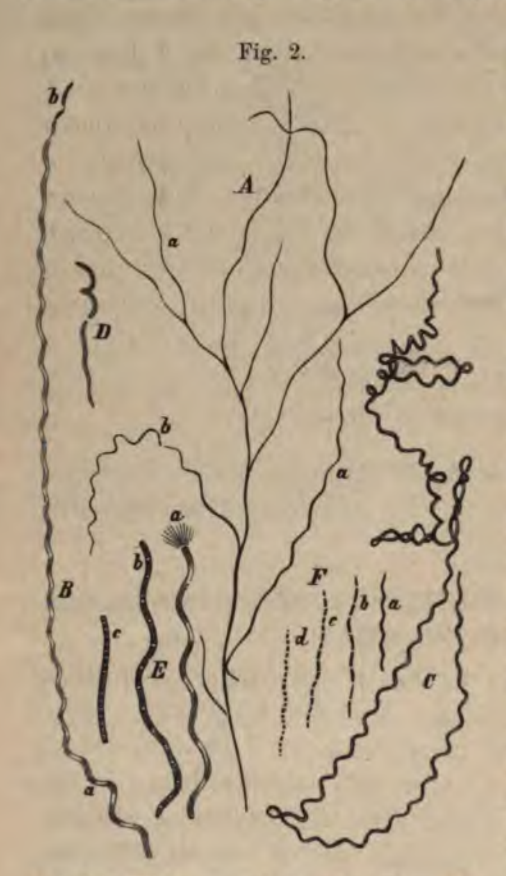
b) Stäbchenformen (nicht: Bacillus!) sind nach einer Richtung deutlich gestreckt und können nach ihrer Länge auch willkürlich in Kurz- (6) und Langstäbchen (7) eingetheilt werden. Der Form nach haben manche Stäbchen deutlich überall gleichen Durchmesser (7, 8), während andere an irgend einer Stelle des Querdurchmessers (10) verbreitert sind, so dass man auch gerade Stäbchen und Spindelstäbchen unterscheiden kann. Die Stäbchen können starr und beweglich sein und im letzteren Falle kann das gerade Stäbchen zu einem gekrümmten werden.

c) Schraubenformen (nicht: Spirillum!) umfassen alle schraubig gedrehten Stäbchen, deren kleinste Formen oft nur wie mehr oder weniger gekrümmte Stäbchen von kommaähnlicher Krümmung (11, 14, 15) erscheinen. Die Schrauben können starr

oder biegsam sein, bald überall gleichen, bald ungleichen Durchmesser haben.

Manche Bakterien lassen eigenthümliche Anhänge, Geisseln, Cilien erkennen, Fig. 1 (7, 9, 14, 16), Fig. 2 (E).

Fig. 2.



Cladothrix dichotoma; nach Zopf. A Verzweigte Pflanze mit schwächer (a) und stärker (b) gewundenen schraubenförmigen Zweigen. B Schraube, deren eines Ende (a) stärker gewunden ist als das andere (b). C langer spirochätenartiger Zweig mit Schlingen und Spirulinen. D Ein Zweigstück mit engen und eins mit flachen Windungen. E Schrauben: a ungegliedert, b mit Andeutung einer Gliederung in längere und c in kürzere Segmente. F Spirochätenform: bei a ungegliedert, bei b bis d schematische Gliederung bei b in längere, c in kürzere Stäbchen und bei d in Kokken.

Die Einzelzellen können frei leben und dann schwankt die Länge der Einzelglieder nach den Arten und Entwickelungsstadien oder sie bilden bei der Vermehrung lockere oder festere Verbände, welche sich den vegetativen Zellen gegenüber oft als Ruheformen documentiren:

A. Das Wachsthum erfolgt in einer Richtung durch Quertheilung. Hierdurch entstehen kürzere oder längere Ketten von Einzelzellen, bei denen bisweilen die Grenzen der Einzelindividuen deutlich zu erkennen, bisweilen aber keine Grenzen zu sehen sind. Das erstere ist besonders bei den Ketten der Kokkenformen (5) und Spindelstäbchen der Fall, das letztere bei den geraden (8) und schraubigen Stäbchen, Fig. 1 (12, 13, 14, 15, 16), Fig. 2 (B, C, E). Im letzteren Falle spricht man auch von Scheinfäden und Schrauben. Die Scheinfäden der Stäbchenformen

sind je nach der Starrheit der Membran bald unbeweglich, bald beweglich, bald gerade, bald wellig gebogen. In ähnlicher Weise sind die Gänge der Schraubenfäden bald eng, bald weit gewunden, die Schrauben bald starr und formbeständig, bald flexil, und bisweilen findet man an demselben Schraubenfaden verschiedene Grade der Windungen, d. h. verschiedene Schraubenformen, Fig. 2 (B, a—b). Bei flexilen Fäden kommt es vor, dass sie Schleifen, Fig. 2 (C), bilden oder sich peitschenschnurartig, Fig. 2 (C), umeinander winden. Bei einzelnen Gattungen macht sich an den Fäden ein Gegensatz von Basis und Spitze bemerkbar und bei einer Gattung tritt eine Art Verzweigung dadurch ein, dass eine Zelle sich aus dem Verbande und der ursprünglichen Wachsthumsrichtung herausschiebt und in der neuen Richtung neben dem alten Faden in loser Verbindung weiter wächst, Fig. 2 (A).

Bei den geraden, welligen und schraubigen Fäden ist man oft im Zweifel, ob die betrachteten Formen Fäden sind, also aus Einzelindividuen zusammengesetzt sind, oder ob sie längere, einzellige, gerade oder gekrümmte Stäbchen oder Schrauben sind. Wenn man also schlechthin von Stäbchen und Schrauben spricht, versteht man zunächst darunter nur den Habituseindruck derartiger Formen und es ist durch die Entwickelungsgeschichte und durch Reagentien in jedem Falle festzustellen, ob die Form eine Einzelzelle oder ein Faden, d. h. ein Verband, eine Kette von Einzelzellen ist.

B. Das Wachsthum erfolgt nicht nach einer Richtung. In der Regel scheint dabei aber die Theilung als Quertheilung zu erfolgen, doch kommt auch, sowohl bei einigen Kokkenformen als selbst bei Stäbchenformen (Pasteuria) eine Längstheilung vor.

a) Es bilden sich dabei flächenartig angeordnete Gruppen, indem z. B. 4 in einer Ebene liegende Zellen als geschlossene Tetrade, Fig. 1 (4), in näherer Beziehung bleiben oder indem sie, bei der Längstheilung der Stäbchen an einem Punkte in Berührung bleibend, eine strahlenförmige Anordnung erkennen lassen.

b) Es bilden sich durch Theilung der Zellen in zwei aufeinander senkrechten Richtungen körperliche Gruppen, indem z. B. waarenballenähnliche Verbände von 8 Zellen entstehen.

c) Die Zellen bilden unregelmässigere Gruppen und bleiben mehr haufenweise vereinigt; dadurch entstehen kugelige, gelappte, traubenförmige Figuren.

Die Einzelzellen können sowohl im freien Zustande als in den Verbänden kleine Formabweichungen erfahren, indem besonders die Stäbchenformen an irgend einer Stelle dicker und dadurch keulenförmig, wetzsteinförmig oder trommelschlägerartig werden. Einzelne dieser Formen scheinen nach Beobachtungen von Hansen an den Essigsäurebakterien und von mir an den Propionsäurebakterien in den normalen Entwicklungskreis zu gehören und mit der Gährwirkung in einer noch nicht ganz klar erkannten Beziehung zu stehen Dies würden wirkliche Involutionsformen sein. Andere derartige Formen bilden sich als Vorstufen der Sporenbildung, Fig. 1 (10), wieder andere stellen sich unter immer deutlicherem Aufquellen als Vorstadien des Absterbens dar und diese letzteren sind wirkliche Degenerationsformen, Fig. 1 (17). Ausser dieser Art des Absterbens giebt es noch eine durch körnigen Zerfall des Inhalts.

Die Einzelzellen und ihre Verbände können durch Aufquellen der äusseren Membranen kleinere oder grössere Schleim-Colonien, Gallertstöcke, Palmella oder Zoogloea genannt, bilden. Die Form der letzteren schwankt nach den Arten und Aussenbedingungen von einfachen Kapseln bis zu feinen Decken und grossen Schleimmassen. Innerhalb der letzteren kann sich wieder eine Gliederung in die kleineren Verbände halten. An der Oberfläche von Flüssigkeiten und festen Medien bilden sie dünnere oder dickere, glatte oder gefaltete Häute, im Inneren von Flüssigkeiten bilden sie kugelige, gelappte, traubige oder verzweigte Massen. Besonders charakteristisch sind die Zoogloeen auf festen Nährsubstraten, wie Kartoffeln, Gelatine oder Agar-Agar. Die Zoogloea ist zur schnellen Orientirung und annähernden Artbestimmung deshalb so wichtig, weil sie unter gleichen physikalischen und chemischen Bedingungen immer in gleicher, typischer Weise wiederkehrt.

Alle Versuche jedoch, diese zur ersten Orientirung so bequeme Wuchsform zum Ausgang einer Klassification zu machen, wie dies bisweilen versucht wurde, müssen deshalb als verfehlt bezeichnet werden, weil die Zoogloea sich mit den Aussenbedingungen verändert, während wir zur Gattung- und Artbestimmung unveränderliche Merkmale nöthig haben.

Es giebt Gattungen und Arten der Bakterien, welche einen kleinen Formenkreis bei ihrer Entwickelung durchlaufen, Fig. 1 (6, 10, 14, 16), während andere, Fig. 2, einen grossen Formenkreis durchlaufen, bei dem eventuell alle bekannten Formen auftreten können. Die Thatsache der Pleomorphie hat an sich nichts mit der Frage der Veränderlichkeit der Formen nach dem Substrate zu thun. In letzterer Hinsicht hat die Erfahrung des Auftretens gleicher Formen unter gleichen Bedingungen bisweilen zu einer Ueberschätzung der Formconstanz geführt, während auf der anderen Seite die Thatsache der Veränderlichkeit einiger Formen nach dem Substrate zu einer Ueberschätzung der Veränderlichkeit der Formen geführt hat. Alle diese Dinge, der Formenkreis unter normalen Verhältnissen, die Formabweichungen unter Veränderung der Bedingungen, sind für jede Species gesondert zu prüfen, da es ohne Rücksicht auf die Grösse des individuellen Formenkreises relativ constante und mehr veränderliche Species giebt.

Mit allen Wuchsformen zusammen kann man aber keine ächten, naturhistorischen Gattungen und Arten, sondern nur Formgattungen und Formarten bestimmen. Zur Speciesbestimmung gehört noch die Kenntniss der ganzen Entwickelungsgeschichte und vor Allem die Kenntniss der Fructification, der Sporenbildung, als des constantesten Formmerkmals.

Die gewöhnlichste Form der Vermehrung der Bakterien ist die Theilung. Dieselbe scheint mit einer vollständigen Umlagerung des Inhalts einherzugehen, wobei sich der färbbare Theil nach Analogie oder Homologie eines Kernfadens verhält. Ich fasse nach derartigen Beobachtungen an einigen grösseren Formen die Theilung als eine indirecte auf, wodurch auch die resultirende Symmetrie der Theilungsproducte sich zwanglos erklärt. Es ist die Möglichkeit offen zu halten, dass es Arten geben kann, welche sich nur durch die vege-

tativen Formen und deren Verbände erhalten. Sicher ist dies allerdings nur von den Kokkenformen und viele andere Formen bilden, wenn die Existenz der Art in Frage steht, Dauerformen in Kokkenform. Die Arterhaltung erfolgt, wenn eine Vermehrung durch Theilung nicht mehr stattfindet, in der einfachsten Form derart, dass einzelne Zellen, ohne ihre Form sichtbar zu ändern, einfach lebensfähig bleiben, während die anderen Zellen absterben.

Einigemal konnte ich deutlich aus der Gruppirung erkennen, dass einzelne morphologisch sich nicht ändernde Zellen dadurch schädlichen Einflüssen entzogen waren, dass die anderen absterbenden Zellen um dieselben als Schutzmantel dienten. In diesen Fällen übernimmt also einfach ein Glied die Arterhaltung und man kann dies als Bildung von Gliedersporen oder Arthrosporen bezeichnen. Diese Form der Arterhaltung erfährt eine sichtbare Steigerung, wenn die arterhaltende Zelle durch Verdickung ihrer Membran selbst direct widerstandsfähiger wird. Dies sieht man besonders bei Ketten von Kokkenformen, Fig. 1 (5), wie Streptokokkus puerperalis, Leukonostok.

Eine noch weitere Ausbildung der Gliedersporen bis zu einer früher als Gonidien bezeichneten Form sieht man bei scheidenbildenden Arten wie Crenothrix, Cladothrix, bei denen sich die arterhaltenden Glieder im Innern der Scheide bilden, die dann von den nachdrängenden Gliedern nach aussen gestossen werden, so dass der obere Abschnitt der Scheide wie ein Sporangium functionirt. Bei diesen Arten können sogar zwei Formen von Gliedersporen vorkommen, grössere und kleinere, welche man in diesen Fällen früher als Makro- und Mikrogonidien bezeichnete. Die Arthrosporen zeigen nach der Art ihrer Bildung häufig eine Neigung in Zoogloeaform aufzutreten.

In allen diesen Fällen scheint die Auskeimung der Gliedersporen, der gewöhnlichen Arthrosporen und der Gonidien, wie das gewöhnliche Wachsthum der vegetativen Zellen vor sich zu gehen und Inhalt und Membran zu treffen. Etwas anders ist dies bei einer ganz abweichenden Form der arterhaltenden Zellen. In diesen Fällen bildet sich im Innern der Muttermembran eine Neuanordnung und Contraction des Inhalts aus, und der contrahirte Inhalt bildet von

Neuem eine eigene Membran. Mit Rücksicht auf die der Contraction vorhergehende, der Theilung sehr ähnlichen Neugruppirung des Inhalts erscheint diese Sporenbildung als eine modificirte Theilung, bei welcher eine Copulation des Inhalts einer grösseren Zelle erfolgt, welche sonst das Material für zwei Zellen liefern würde. Die Endosporenbildung erscheint mir hiernach als wirkliche Fructification, als einfachste Form einer Art geschlechtlichen Fortpflanzung, der Copulation, zur besseren Anpassung an die Art bedrohenden Aussenbedingungen. Es entsteht also in der Mutterzelle, welche dabei ihre ursprüngliche Form behält, Fig. 1 (8, 9), oder verändert, Fig. 1 (10, 12), eine mit eigener Membran versehene Spore, endogene Spore oder Endospore, Fig. 1 (8, 9, 10, 12). Auch bei diesen finden wir kleine Differenzen. Bei einigen Arten, wie Sarcina oder einigen Kurzstäbchen, scheint der ganze Inhalt der Mutterzelle zur Endospore zu werden, während bei anderen Arten deutlich nur der grössere Theil des Zellinhaltes zur Spore wird und ein Theil des Inhalts unverbraucht zurückbleibt, der dann körnig zu Grunde geht. Die Auskeimung der Endosporen, Fig. 1 (18, 19), erfolgt unter Verlust, Sprengung und Quellung der Sporenmembran und nur der Inhalt der Endospore wird zur jungen vegetativen Zelle.

Die Endosporen verknüpfen phylogenetisch die Bakterien mit den Flagellaten und Myzetozoen, deren morphologisch ähnlicher Encystirungsprocess auch nur eine besondere Anpassung an die Art bedrohenden Aussenbedingungen ist; auch die besonders von Löffler mehr und mehr nachgewiesenen Cilien weisen auch phylogenetische Beziehungen zu den Flagellaten, während die Bakterien durch die Arthrosporen und durch die pleomorphen Arten, wie Crenothrix, Cladothrix, Beggiatoa, auch zu den Spaltalgen hinüberleiten. Phylogenetische Beziehungen zu den ächten Pilzen fehlen den Bakterien und der Mangel an Chlorophyll ist ein nicht einmal durchgreifendes physiologisches, aber kein morphologisches Merkmal. Dagegen lassen sich gelegentlich bei manchen Kokkenformen (z. B. nach Schottelius bei M. prodigiosus), besonders aber bei Involutionsformen der Stäbchen- und Fadenformen Sprossbildungen beobachten, welche vielleicht auf phylogenetische Beziehungen zu den Torula- und Saccharomycesarten hinweisen.

Auf Grund der geschilderten morphologischen und entwickelungsgeschichtlichen Momente scheiden de Bary und ich die Bakterien in die zwei grossen Gruppen der arthrosporen und der endosporen Arten. Da man aber zunächst immer nur Formen sieht, während die Entwickelungsgeschichte erst durch besondere Untersuchungen festgestellt werden muss, empfiehlt es sich zur Orientirung von den Formen auszugehen, wobei die vegetativen Formen auf und in den spontan befallenen todten oder lebenden Substraten und ihre dort vorkommenden Formverbände den natürlichen Ausgangspunkt bilden. Zu dieser Orientirung kann das folgende System als Anhalt dienen.

I. Kokkaceen bilden im vegetativen Stadium Kokkenformen:
   1. Gattung: Mikrokokkus, charakterisirt durch unregelmässige Anordnung der Zellen und Zellverbände.
   2. Gattung: Sarcina bildet waarenballenähnliche Packete der Zellen.
   3. Gattung: Streptokokkus bildet Ketten in Kokkenformen.

II. Bakteriaceen bilden im vegetativen Stadium Stäbchenformen, welche auf bestimmten Medien Ketten oder Fäden bilden:
   1. Gattung: Bakterium hat Arthrosporen oder bildet doch keine Endosporen.
   2. Gattung: Bacillus bildet Endosporen.

III. Spirobakteriaceen bilden im vegetativen Stadium kürzere Schraubenstäbchen (Kommaformen, S-Formen), welche auch in längere Schraubenfäden auswachsen:
   1. Gattung: Spirochaeta mit Arthrosporen resp. ohne Endosporen.
   2. Gattung: Spirillum mit Endosporen.

IV. Leptothricheen bilden im vegetativen Stadium Stäbchen, welche meist längere Fäden bilden:
   1. Gattung: Leptothrix unterscheidet sich von den arthrosporen Bakteriaceen dadurch, dass die Fäden einen Gegensatz von Basis und Spitze zeigen.
   2. Gattung: Beggiatoa; die Fäden ohne Scheide; die Zellen enthalten Schwefelkörner.

3. Gattung: Phragmidiothrix; die Fäden sind in niedrige Cylinderscheiben gegliedert, welche in Halbscheiben, Quadranten und schliesslich in Kugeln zerfallen.
4. Gattung: Crenothrix; die Fäden zeigen Scheidenbildung.

V. Cladothricheen: die vegetativen Zellen gehören den Stäbchenformen an; die Stäbchen bilden Scheiden und zeigen Verzweigung.

Gattung: Cladothrix.

Nach dieser die bekannten Formen der Einzelzellen, die charakteristischen Formverbände und ihre Fructification berücksichtigenden orientirenden Eintheilung kann z. B. die gekrümmte Form der Einzelzellen bei den Parasiten der Cholera asiatica, den sogenannten Kommabacillen, über die Stellung derselben allein gar nichts aussagen, dagegen beweist der Mangel von Endosporen sofort, dass sie weder Bacillen noch Spirillen sind und die Bildung der Schraubenfäden weist sie deshalb den Spirochaeten zu. Beurtheilt man die Kommabacillen mit Zirkel und Lineal, so können sie schliesslich bei jeder Gruppe untergebracht werden, sowohl bei den Bakterien als Bacillen, sowohl bei Spirochaeten als Spirillen, und sie könnten eben so gut als Entwickelungsformen aus dem Kreise der Leptothricheen oder Cladothricheen aufgefasst werden. Nach meiner Auffassung genügt es vorläufig die nicht endosporen Stäbchenarten, welche keinen Gegensatz von Basis und Spitze zeigen, als Bakterien s. str. zu bezeichnen, dagegen ist es ungenau, dieselben als Bacillen zu bezeichnen, weil der letztere Name nach den Regeln der morphologischen Priorität nur auf endospore Stäbchen und fadenbildende Arten angewendet werden darf, und diese bewährten Regeln dürfen von den Medicinern nicht ohne Grund vernachlässigt werden.

In den letzten Jahren ist ganz grundlos und überflüssiger Weise der Mikrokokkus prodigiosus als Bacillus bezeichnet worden, weil bisweilen die Zellen nicht genau kugelig sind, im Uebrigen fehlt ihm das zur Gattung Bacillus gehörige wesentliche Merkmal vollständig, da er keine Endosporen bildet. Während man vielleicht auf Grund neuester Untersuchungen zweifelhaft sein könnte, ob er nicht vielleicht zu den Bakterien s. str. gestellt werden kann, gehört er

sicher nicht zu den Bacillen, da hierüber die Länge eines Zellchens gar nichts aussagt. Wer ihn ruhig weiter zur Gattung Mikrokokkus rechnet, begeht auf jeden Fall einen ganz unbedeutenden Fehler im Vergleiche zu dem groben morphologischen Verstosse, der in diesem Falle im Namen Bacillus liegt. Es ist wünschenswerth, dass sich die Anfänger wenigstens von der falschen Auffassung frei machen, dass man eine Gattung nach einer einzigen Form bestimmt und diese Form mit dem Maassstabe statt nach morphologischen Regeln ermittelt. Die bis jetzt aufgestellten Gattungen oder Untergattungen entsprechen auf jeden Fall der Anzahl der wirklichen Gattungen noch nicht und unter der Gruppe allein, welche ich in dem obigen Schlüssel Bakterium nannte, und ebenso unter der grossen Gruppe der Bacillen kommen so gewaltige Differenzen vor, dass jeder Morphologe bei jeder anderen Gruppe von Mikroorganismen derartige Gattungen in mehrere Gattungen oder Untergattungen auflösen müsste. So nennt z. B. der Mediciner die Parasiten von Milzbrand, Abdominaltyphus und Tuberkulose gleichmässig Bacillen und rechnet sie damit zu ein und derselben Gattung. Aber selbst abgesehen davon, dass bei Typhus- und Tuberkelbacillen Endosporen nicht nachgewiesen worden sind, verhalten sich diese Arten morphologisch so gründlich verschieden, dass jeder Morphologe sie als zu drei verschiedenen Gattungen oder doch Untergattungen gehörig bezeichnen müsste und die eingebürgerte medicinische Bezeichnung Bacillus nur als Verlegenheitsausdruck gelten lassen kann, welcher aber noch einer Auflösung in Untergattungen harrt. Ferner ist zu berücksichtigen, dass sich unter den pathogenen Kokken-, Stäbchen- und Schraubenformen solche finden können, welche nur unter diesen Bedingungen des Parasitismus in den zuerst bekannt gewordenen einfachen Formen vorkommen, welche aber in Wirklichkeit nur Entwicklungsformen höherer pleomorpher Arten sind. Unter diesen Umständen dürfte auch der folgende zur weiteren Bestimmung dienende Schlüssel über die Gattungen wohl noch weit hinter der wirklichen Vielheit zurückbleiben.

Kokkenformen der vegetativen Stadien	die Einzelzellen zu Ketten angeordnet	Zoogloea, mässig	mit Endosporen	Endo-Streptokokkus.
			ohne Endosporen	Arthro-Streptokokkus.
		Zoogloea sehr stark		Leukonostok.
	zu 4 angeordnet, daneben kleine Ketten	ohne Endosporen? nur Arthrosporen?		Merista.
	zu 4 angeordnet, keine Ketten zu 8 angeordnet	mit Endosporen (auch ohne Endosporen?)		Sarcina.
	unregelmässige Haufen	ganz unbestimmte Gruppirung		Mikrokokkus.
		in Traubenform- „		Staphylokokkus.
		Zoogloea kugelig gegliedert		Askokokkus.
Stäbchenformen der vegetativen Stadien.	als Verbände d. Einzelzellen kleinere oder längere Ketten resp. Fäden, ohne Gegensatz von Basis und Spitze; Einzelzellen und Fäden flexil oder starr	Fäden gerade oder wellig, ohne Endosporen resp. mit Arthrosporen		Bakterium.
		Fäden gerade, wellig oder schraubig, keine Endosporen resp. mit Arthrosporen		Spirulina (Proteus)
		Fäden gerade oder wellig, mit Endosporen	ohne Veränderung der geraden Stäbchen bei der Sporenbildung	Bacillus.
			Spindelstäbchen od. Veränderung der geraden Stäbchen bei der Sporenbildung	Clostridium.
	keine Fäden, Spindelstäbchen mit Längstheilung. Endosporen			Pasteuria.
	Fäden mit Gegensatz von Basis und Spitze	Fäden ohne Scheide	ohne Einlagerung von Schwefelkörnern	Leptothrix.
			mit Einlagerung von Schwefelkörnern	Beggiatoa.
		Fäden mit Scheide	unverzweigt	Crenothrix.
			verzweigt	Cladothrix.
Schraubenformen der vegetativen Stadien	als Verbände d. Einzelzellen schraubige Fäden; Zellen u. Fäden flexil oder starr	ohne Endosporen resp. mit Arthrosporen		Spirochaeta.
		mit Endosporen	ohne Aenderung der Zellform bei der Sporenbildung	Spirillum.
			mit Aenderung der Zellform bei der Sporenbildung	Vibrio.

2. Das Bakterien-Mikroskop und die Hülfsapparate.

Litteratur zur weiteren Orientirung über das Mikroskop und die mikroskopische Technik.

Behrens: Hülfsbuch zur Ausführung mikroskopischer Untersuchungen. 1883.
Behrens: Tabellen zum Gebrauche bei mikroskopischen Arbeiten. 1887.
Behrens: Leitfaden der botanischen Mikroskopie. 1890.
Behrens, Kossel und Schiefferdecker: Das Mikroskop. 1889.
Bizzozero et Firket: Manuel de Microscopie clinique. 2. Aufl. 1885.
Dippel: Das Mikroskop. 2. Aufl. I. 1882/83, und Grundzüge der allgemeinen Mikroskopie. 1885.
Fol: Lehrbuch der vergl. mikroskop. Anatomie. 1884. I. Technik.
Friedländer: Mikroskopische Technik. 4. Aufl. von Eberth. 1889.
Huber und Becker: Die pathologisch-histologischen und bakteriologischen Untersuchungs-Methoden. 1886.
Kitt: Bakteriologische und pathologisch-histologische Uebungen. 1889.
Meisel: Lehrbuch der Optik. 3. Aufl. von Barfus. 1889.
Strassburger: Das botanische Practicum. 2. Aufl. 1887.
Strassburger: Das kleine botanische Practicum. 1884.

Bei ungefärbten Präparaten kommt das Bild dadurch zu Stande, dass die Objecte wegen ihres von der Einschlussflüssigkeit abweichenden Lichtbrechungsvermögens nach Koch „durch Diffraction der durchgehenden Lichtstrahlen ein aus Linien und Schatten bestehendes Bild, das Structurbild“ liefern. Man beobachtet in diesen Fällen auch Mikroorganismen mit Blenden, wie bei den gewöhnlichen histologischen Arbeiten, bei denen man das Structur- oder Diffractionsbild beobachten will. Dieses Bild der Zellen und Gewebsbestandtheile wird demnach durch absichtliches sehr starkes Hervorheben der Umrisse der Gegenstände zugänglich, während der Inhalt dieser selben Objecte dadurch undeutlicher wird oder sich der Wahrnehmung ganz entzieht. Reicht das diffuse Tageslicht nicht aus, um den stärkeren Objectivsystemen genügend Licht zuzuführen, so bedient man sich eines Condensors, der nicht das Structurbild auslöschen, sondern das ungenügende Licht verstärken soll. Für diese Art der mikroskopischen Beobachtung dürften wohl von allen Condensoren der achromatische Condensor der grösseren

englischen Instrumente und der Abbé'sche Beleuchtungsapparat die besten sein.

Die Trockensysteme reichen für die meisten Bakterien und Amoeboiden nicht aus, um nur annähernd richtig die Form zu erkennen. Man muss deshalb schon bei dieser Art der Untersuchung Immersionssysteme anwenden, bei denen nach Amici die Luftschicht durch ein stärker brechendes Medium ersetzt wird, welches den Fehler beim Austritt der Strahlen aus dem Deckglase möglichst corrigirt. Da Deckglas und Frontlinse der Objective aus Kronglas bestehen, so corrigirt Wasser wegen zu geringen Brechungsexponenten den Fehler nicht ganz, so dass bei den Wasserimmersions-Systemen Correctionsfassung und besondere Deckglasdicke erforderlich werden. Die Correction wird aber erreicht, wenn die Immersionsflüssigkeit denselben Brechungsexponenten hat wie Kronglas. Eine solche Flüssigkeit stellt nach Abbé[1]) „eine optisch homogene Verbindung her zwischen dem Präparat und dem Objectiv, welche alle Brechung der Lichtstrahlen vor der ersten kugelförmigen Fläche des optischen Systems aufhebt.“

Hierdurch wird der Lichtverlust durch Reflexion an Trennungsflächen optisch verschiedener Medien beseitigt und zugleich „ein sehr erheblicher Betrag von sphärischer Aberration im Entstehen unterdrückt. Ausserdem kann die Correctionsfassung wegfallen, und die Deckglasdicke bedarf keiner so sorgfältigen Controle, „denn sobald das Zwischenmedium in Refraction und Dispersion dem Deckglase gleichartig ist, wird es für die optische Wirkung gleichgiltig, ob eine dickere Schicht Glas und eine entsprechend dünnere Schicht der Flüssigkeit, oder umgekehrt, zwischen Object und Linsensystem eingeschaltet ist.“

In diesem Sinne war von Amici zur Steigerung des Brechungsexponenten Anisöl, von Spencer Glycerin verwendet worden. Neben der Beseitigung der Deckglas-Correction verlangte Stephenson[2])

---

[1]) Ueber Stephenson's System der homogenen Immersion. Sitzungsberichte der Jenaischen Gesellschaft f. Med. und Naturw. 1879. 10. Januar.

[2]) On a large-angled immersion-objective. Journal of the R. Mikroskop. Society. 1878. p. 51.

zugleich zur Steigerung des Unterscheidungs-Vermögens Vergrösserung des Oeffnungswinkels. Diese Verbindung beider Postulate durch Stephenson, ihre Berechnung durch Abbé, ihre Construction durch Zeiss und die Einführung dieser Systeme für **homogene Immersion** durch Koch[1]) bezeichnen für die mikroskopische Seite der Bakterienforschung einen neuen Aufschwung.

Die beste Flüssigkeit ist das ätherische Cedernholz-Oel, dessen Brechungsindex dem des Kronglases gleich ist, dessen Dispersion diejenige des Kronglases nur in geringem Grade übertrifft. In bestimmter Weise eingedickt bietet es die meisten optischen Vortheile mit bequemer Handhabung. Durch Vermischung anderer, stärker brechender ätherischer Oele, wie Nelken-, Fenchel-, Anis-Oel, mit Oliven- oder Ricinus-Oel, kann man Immersions-Flüssigkeiten erhalten, welche der mittleren Lichtbrechung des Cedernöles gleichkommen oder dieselben in bestimmtem Grade noch übertreffen.

In Folge der Beseitigungen der lästigen Deckglascorrection, welche aber den, durch verschiedene Tubuslänge erreichten Einfluss verschiedenen Bildabstandes auf die Aberration in feiner Weise zu compensiren gestattet, sind die Objective für homogene Immersion immer für bestimmte Tubuslänge adjustirt. Es ist deshalb zu beachten, dass Verlängerung des Tubus über diese Normallänge im Sinne der sphärischen Uebercorrection, Verkürzung im Sinne der Untercorrection wirkt. Bei richtiger Wahl der Tubuslänge wird die Abberation vollständig beseitigt, wenigstens für die bei den wissenschaftlichen Arbeiten erforderlichen Präparations- und Einbettungsmethoden, und die Definition, d. h. die Reinheit und Vollkommenheit der Bildzeichnung lässt nichts zu wünschen übrig. Der Vortheil für das praktische Arbeiten, wie er aus dem Wegfallen der Correctionsfassung resultirt, ist aber gar nicht hoch genug anzuschlagen von Jemanden, der das Mikroskop als Mittel zum Zwecke wissenschaftlicher Forschung gebraucht. Wer die Mikroskopie als Sport treibt und im Betrachten von Diatomeenschaalen und anderen schönen Präparaten aufgeht, mag mit den Correctionsfassungen seine Zeit todt schlagen, um einer idealen Definition nachzugehen und die

---

[1]) Untersuchungen über die Aetiologie der Wundinfectionskrankheiten. 1878.

Abberation auch für alle die Präparationsmethoden zu beseitigen, die für wissenschaftliche Arbeiten überflüssig sind. Die Deckglasdicke erfordert im Allgemeinen bei Anwendung der homogenen Immersion, besonders bei den schwachen Systemen von $^1/_{10}$ bis $^1/_{12}$, keine besondere Beachtung, doch ist es gut, hierin auch nicht zu bequem zu sein. Für besondere Arbeiten wird man gut thun, sich mindestens zwei verschiedene Deckglasdicken auszuprobiren, von denen die eine für die zu Gebote stehende schwächste Immersionslinse ($^1/_{10}$ bis etwa $^1/_{14}$), die andere für die stärkste Linse (von $^1/_{16}$ bis $^1/_{20}$) etwas sorgfältiger gewählt ist.

Nach histologischer Tradition, welche durch den früheren Zustand der Instrumente bedingt war, soll man Steigerungen der Vergrösserung mehr durch Steigerung der Objective als der Oculare erstreben. Nach rein physikalischen Ermittelungen hängt aber die Stärke der Oculare, welche ein Objectiv mit Vortheil verträgt, vom Oeffnungswinkel des letzteren ab. Je grösser der Oeffnungswinkel, desto stärker kann ceteris paribus das Ocular sein. Unsere besten homogenen Systeme entsprechen diesem Postulate derart, dass man dieselben durch Anwendung der starken Oculare ziemlich ausnutzen kann, wenn der Beleuchtungsapparat entsprechend stark ist und genügende Appertur hat.

Die ungefärbten Mikroorganismen werden unter Anwendung von Blenden beobachtet, wenn das Structurbild als Umrissbild beobachtet werden soll. Sind aber in einem durch sein Structurbild kenntlich gemachten Gewebe oder ähnlichem grösseren Objecte mit vielen Schatten kleine Partikel, z. B. von der Grösse von Bakterien, eingelagert, so können diese Partikel durch die Schatten des Structurbildes verdeckt werden. Sind diese Partikel gefärbt, so werden sie trotz der Schatten bei einer gewissen Grösse in Folge ihrer Färbung noch sichtbar bleiben. Unter einer gewissen Grösse werden sie aber schliesslich trotz der Färbung durch die Schatten des Structurbildes verdeckt, weil ihre eigenen Umrisse nicht scharf genug sind, um einen Umriss als Structurbild zu liefern oder gegen die vielen anderen Schatten aufzukommen. Bei der Abblendung werden sich nur solche Objecte deutlich

abheben, welche scharfe Contouren haben, und diese Umrisszeichnungen sind um so deutlicher, je reiner der centrale Charakter der Beleuchtung ist. Würde man dieselben Objecte ohne Abblendung, also unter Verzicht auf eine rein centrale Beleuchtung, bei offenem Condensor betrachten, so würden bei der grossen Appertur dieser Beleuchtungsapparate neben den centralen Strahlen auch mehr und mehr schiefe Strahlen das Object treffen. Da nun auch gleichzeitig das Auflösungsvermögen der neuen Objective, besonders der Systeme für homogene Immersion, sehr gross ist, so müssen bei einer solchen Beleuchtung die reinen Umrisszeichnungen etwas an Deutlichkeit verlieren, oft bis zum scheinbaren Verschwinden, dafür müssen aber Einzelheiten zur Wahrnehmung kommen, z. B. Körner im Innern der Zellen, welche vorher nicht zu sehen waren. Es ist lediglich die relative Unempfänglichkeit unseres Auges und die Unfähigkeit, solche diabolischen Beleuchtungen lange auszuhalten, welche uns das Aufsuchen dieser Einzelheiten bei Abwesenheit von Färbungen erschwert. Dass die Sache sich wirklich so verhält, haben C. Fränkel und R. Pfeiffer durch die Photographie ungefärbter Bakterien bei offenem Condensor bewiesen. Steigert man aber die Empfindlichkeit des Auges für das Aufsuchen dieser Einzelheiten, indem man sie färbt, so absorbiren diese gefärbten Theile das ganze Licht oder grössere Theile desselben und mildern dadurch den ermüdenden und lähmenden Einfluss der concentrirten Lichtmasse für unser Auge, so dass wir schneller finden, länger beobachten und so wirklich sehen können.

Historisch möchte ich in dieser Hinsicht daran erinnern, dass man im ganzen vorigen Jahrhundert bis in das unsrige hinein mit den damaligen mässigen Instrumenten im vollen Sonnenlichte ohne Blenden beobachtete. Hierdurch kam in fast alle Objecte eine gewisse Dispersion des Lichtes und man sah fast überall Kügelchen. Diese fasste man dann im Gegensatze zu den Fasern Haller's als die eigentlichen Elementargebilde auf. Erst die Einführung der Blendung lehrte die Zellen kennen und erst neuerdings wendet sich die Aufmerksamkeit wieder dem Inhalte der Zellen zu, in denen wir in anderer und besserer Weise als früher eine feinere Zusammensetzung erkennen, bei welcher Körner die erste Rolle

zu spielen scheinen. Bei dem Nachweise dieser Feinheiten kommen alle obigen Punkte von Neuem zur Geltung.

Es gilt desshalb oft die Bakterien zu färben und die Beleuchtung so einzurichten, dass das Structurbild nicht mehr stört, sondern das Farbenbild möglichst rein, isolirt, zur Beobachtung kommt. Diese Isolirung des Farbenbildes erreichte Koch l. c. indem er die Blenden entfernte. Dadurch wurde ein schwaches Structurbild schon so aufgehoben, dass das Farbenbild selbst kleinster Partikel deutlich wurde. Bei stärkeren Structurbildern erreichte er das aber erst als er unter Entfernung der Blenden einen Condensor anwandte, welcher einen so intensiven Lichtkegel auf das Object warf, „dass die Diffractionserscheinungen gänzlich zum Verschwinden gebracht" wurden.

Bei solcher Beleuchtung, bei der „das Präparat in allen Richtungen gleichzeitig von einfallenden Strahlen durchsetzt" wird, „bleiben im Bilde allein diejenigen Elemente sichtbar, die in Folge von Tinction absorbirend wirken." Weiter gewinnt hierdurch nach Abbé die Beobachtung, „obwohl die Beleuchtung dem Namen nach central bleibt, die wesentlichen Vortheile der schiefen Beleuchtung durch die Mitwirkung von Strahlen in grosser Neigung gegen die Axe des Mikroskops." Nach der obigen Darlegung erscheint theoretisch die Beobachtungsweise eines reinen Structurbildes und eines reinen Farbenbildes weniger durchgreifend als nach Koch's früherer Darlegung, besonders auch weil wirklich farblose Objecte nicht so zahlreich sind und alle möglichen Uebergänge vorkommen. Praktisch bleibt aber die Darstellung von Koch zu Recht bestehen.

Wegen dieses Mitwirkens der schiefen Beleuchtung bei Beobachtung des isolirten Farbenbildes und bei der Photographie ungefärbter Mikrobien und zur vollen Entwicklung des hierzu erforderlichen Unterscheidungsvermögens der Objective für homogene Immersion, welches nach Stephenson durch den grossen Oeffnungswinkel der Objective erreicht wird, muss der Beleuchtungsapparat einen Strahlenkegel von mindestens gleicher Appertur liefern. Dies wird in einer allen Anforderungen entsprechenden Weise durch den Abbé'schen Beleuchtungs-Apparat erreicht. Um auch das Structurbild

als Umrissbild bei Vorhandensein dieses Condensors und trotz desselben beobachten zu können, ist an vielen Instrumenten eine Vorrichtung zum Einschalten von Blenden angebracht, die man in verschiedener Grösse vorräthig halten muss, während an anderen die Einrichtung getroffen ist, dass der ganze Beleuchtungs-Apparat schnell gegen gewöhnliche Beleuchtung und Blendung ausgewechselt werden kann. Ausser den gewöhnlichen Blenden oder einer dieselben ersetzenden Irisblende bedarf man zur besseren Ausnutzung der schiefen Strahlen und zur sogenannten Dunkelgrundbeleuchtung auch noch centraler Blenden und, um die Beleuchtung ganz einseitig zu machen, Blenden, in denen ein Kreisquadrant herausgeschnitten ist. Ich empfehle übrigens auch für histologische Arbeiten den Condensor nicht auszuschalten, sondern sich an denselben durch Verwendung der Blenden zu gewöhnen.

Zur Bakterienforschung gehört neben den Systemen für homogene Immersion ein Abbé'cher **Beleuchtungs-Apparat.** Hin und wieder kann es selbst nothwendig werden, zwischen Beleuchtungsapparat und untere Seite des Objectträgers einen Tropfen der Immersionsflüssigkeit einzuschalten, sodass unten und oben continuirliche, homogene Verbindung hergestellt ist. Derartige Immersions-Condensoren, welche bei den stärksten Systemen und der Mikrophotographie mehr und mehr Eingang finden, hat man übrigens schon früher angewendet, ehe man den Werth der homogenen Verbindung richtig erkannt und constructiv verwerthet hatte.

Das Linsensystem des Abbé'schen Condensors ist mit Rücksicht auf die üblichen Stärken der guten Objectträger so construirt, dass sein Brennpunkt für parallel eintretende Strahlen sehr nahe, etwa 2 mm über seiner oberen Linse liegt. Um die Strahlen aber auch wirklich parallel in den Condensor eintreten zu lassen, müssen sie mit einem Planspiegel von der Lichtquelle her aufgefangen und so dem Condensor zugeführt werden. Bei Verwendung eines Hohlspiegels würden convergirende Strahlen in den Condensor treten, deren Brennpunkt viel näher der oberen Linse, also tiefer als das auf dem Objectträger befindliche Object liegen würde. Um ein scharfes Bild zu bekommen, muss das Object und das reelle, durch den Condensor in das Object projicirte Bild der Lichtquelle

scharf in ein und derselben Objectebene vereinigt werden. Dieses physikalisch selbstverständliche, von Koch längst scharf hervorgehobene Postulat hat Günther neuerdings das „Princip der maximalen Beleuchtung" genannt.

Die Lage des Objectes ist durch Objectträger, Einschlussweise und Deckglas gegeben. Der Brennpunkt des Condensors muss aber etwas schwanken, je nachdem die Lichtquelle weiter entfernt und die Strahlen wirklich streng parallel sind oder wenn sie etwas näher ist, z. B. bei Verwendung einer Lampe. Bei entfernter Lichtquelle liegt der Vereinigungspunkt ihrer Strahlen etwas näher an der oberen Linse als bei näherer Lichtquelle, sodass im ersten Falle der Condensor dem Präparate näher, im zweiten etwas tiefer sein muss. Dieser Umstand und der weitere, dass man mit verschiedenen Einschlussmethoden, mit verschieden starken gewöhnlichen Objectträgern und mit ganz besonders construirten Objectträgern für bestimmte Zwecke, sog. feuchten Kammern von ganz verschiedenartiger Stärke arbeitet, macht es nothwendig, dass der Condensor verschiebbar ist. Stets ist aber an der Forderung der Deckung von Object und Lichtbild festzuhalten. Die bisweilen aus Bequemlichkeit üblichen Abblendungen durch ganz beliebiges Herabsetzen des Condensors widersprechen der Grundlage der Construction.

Als Lichtquelle empfiehlt sich bei Tag eine weisse Wolke, niemals jedoch directes Sonnenlicht. Bei unzureichender Tagesbeleuchtung und bei Abend können die meisten Gas- und Petroleumlampen direct benutzt werden, wenn man irgendwo, durch Einschalten eines entsprechend helleren oder dunkleren blauen Schirmes die zu gelben Strahlen dieser Lichtquellen mildert. Dies kann man durch Auflegen eines Kobaltglases auf das Ocular, oder durch Einschalten einer Kobaltglasscheibe, oder einer mit Kupfervitriollösung gefüllten Cuvette oder Schusterkugel zwischen Lichtquelle und Spiegel des Mikroskopes erreichen. Diese blauen Gläser oder Lösungen müssen in verschiedenen Nuancen zu Gebote stehen. Auch die Koch's'che Lampe eignet sich, doch muss bei derselben der Condensor ausgeschaltet werden. Am meisten empfiehlt sich wohl von allen künstlichen Lichtquellen das Auer'sche Glühlicht, welches bei seiner fast rein weissen Farbe fast genau wie bei diffusem weissem Tageslicht zu

arbeiten gestattet und alle angedeuteten Unbequemlichkeiten überflüssig macht.

Bei einem zu Bakterienuntersuchungen dienenden Mikroskope muss sich ein homogenes Immersions-System von ca. $^1/_{12}$, ferner ein starkes und ein schwaches Trockensystem befinden. Hierzu gehört ein Satz Oculare, von denen eines mit Mikrometer versehen sein soll. Die stärkeren Systeme von etwa $^1/_{18}$ werden relativ so selten gebraucht und sind so theuer, dass dieselben nicht von Jedem angeschafft werden können. Dieselben dienen ausserdem fast nur zur Entscheidung ganz schwieriger morphologischer Fragen, während die meisten Aufgaben und darunter wohl alle medicinischen mit $^1/_{12}$ gelöst werden können, vorausgesetzt, dass dasselbe so exact gearbeitet ist, dass es die stärkeren Oculare verträgt. Bei der Auswahl soll man sich nicht von einem Momentaneindrucke leiten lassen, sondern sich nur nach einer sorgfältigen, alle Momente berücksichtigenden Prüfung entscheiden. Das billige Instrument kann — und dies ist bis jetzt die Regel — sehr theuer werden, wenn sein niedriger Preis durch schlechte Ausführung, durch billige Arbeitskräfte erzielt wurde, während umgekehrt die theueren Systeme und Instrumente sich meist in Folge gleichmässiger und gediegener Ausführung, Sicherheit und Bequemlichkeit der Handhabung als verhältnissmässig billig erweisen. Von deutschen Firmen liefern sämmtliche Systeme von homogener Immersion in guter und gleichmässiger Ausführung: Zeiss-Jena, Seibert-Wetzlar und Winkler-Göttingen. Gute und leidlich gleichmässige Systeme liefern auch Hartnack-Potzdam, Klönne und Müller-Berlin, Reichert-Wien. Von den anderen Firmen habe ich nur selten diesen ganz gleichwerthige, vor allem nicht genug gleichmässige Arbeit gesehen. Von auswärtigen Firmen liefern Powell und Lealand die besten Systeme für homogene Immersion, welche den Vergleich mit Zeiss vollständig aushalten und ungefähr dasselbe kosten, während ihre Trockensysteme zur Zeit wohl die besten sein dürften.

Im Laboratorium wird das Mikroskop am besten unter einer Glasglocke so aufbewahrt, dass kein directes Sonnenlicht die Glastheile, besonders den Spiegel trifft. Soll eine längere Pause ein-

treten, so müssen die vorher sorgfällig gereinigten Objective in die zugehörigen Messingkapseln eingeschlossen werden.

Statt eines besonderen Präparir-Mikroskopes genügt es für die meisten Zwecke, wenn man sich noch ausser den genannten Systemen ein schwaches System mit starkem Abstande anschafft. Für den bequemen Gebrauch der Objective wählt man einen Revolver oder man lässt eine von Zeiss neuerdings construirte Einrichtung am Stativ zum Auswechseln der genau centrirten Objective anbringen.

Die deutschen Forscher haben im Allgemeinen eine Abneigung gegen binoculare Mikroskope, von der man am schnellsten kurirt wird, wenn man einmal die grosse Leistungsfähigkeit der englischen Instrumente an geeigneten Präparaten kennen gelernt hat. Sicher wären wohl manche Differenzen über Arten der Bewegung von Mikroorganismen, über feine Formverhältnisse, über Beziehungen zu Zellen leichter zu lösen, wenn wir im Besitze guter binocularer Instrumente für die stärkeren Vergrösserungen wären, und ich möchte nur wünschen, dass bei den grossen Fortschritten der letzten Jahre auch dieser Seite der Technik wieder die gebührende Aufmerksamkeit geschenkt würde.

In den letzten Jahren fangen unsere Firmen in erfreulicher Weise an, dem Tische des Mikroskops nach guten englischen Vorbildern mehr Aufmerksamkeit zu widmen, während ich noch in der 3. Auflage hierüber nichts Erfreuliches mitzutheilen hatte. Der Tisch soll so gross sein, dass man eine Kulturplatte auf demselben durchmustern und die Präparationen — zu denen man sonst eines besonderen Präparirmikroskops bedürfte — auf demselben ausführen kann. Zum schnellen Orientiren und Wiederfinden der Objecte sollte derselbe von vornherein derart construirt sein, dass das Object durch Schrauben in zwei aufeinander senkrechten Richtungen mechanisch durch das Gesichtsfeld geführt werden kann. Da dies nur an den grossen Stativen möglich ist, hat Pantoczek[1]) einen festen Indicator angegeben, welcher auch an den kleinen Tischen angebracht werden kann, und der mir wegen seiner Bequemlichkeit und Sicher-

---

[1]) Zeitschrift f. w. Mikroskopie 1888, Bd. V, S. 39.

heit als stabile Einrichtung an Bakterienmikroskopen empfehlenswerth erscheint.

Vielfach hat man in den letzten Jahren bewegliche, an jedem Mikroskop anbringbare Indicatore in Form beweglicher Objecttische construirt, von denen mir der von Klönne und Müller[1]) und der von Reichert[2]) recht brauchbar erscheinen. Auch Cramer[3]) und Schiefferdecker[4]) haben brauchbare Anordnungen angegeben, so dass jetzt wohl jede mikroskopische Firma im Stande sein dürfte, einen solchen Hülfsapparat zum Durchmustern und Wiederauffinden der Objecte oder besonders zu markirenden Theile derselben anzufertigen.

Die bis jetzt betrachteten Objective werden mit Flint- und Kronglas hergestellt, welche nicht alle optischen Fehler beseitigen lassen, welche zum vollen Ausnutzen der physikalischen Eigenschaften beseitigt sein müssten. Den Bemühungen von Abbé, Schott und Zeiss ist es nun in den letzten Jahren mehr und mehr gelungen, einige der wichtigsten, noch gebliebenen Fehler durch Einführung neuer Glassorten: Silicium-, Phosphat- und Boratgläser und durch eine eigenartige Construction der Systeme bis auf nicht oder kaum noch störende Reste aufzuheben.[5])

Bei Verwendung von Flint- und Kronglas konnten auch bei den besten Systemen nur zwei verschiedene Farben des Spectrums in demselben Focus vereinigt werden und die unvermeidliche Abweichung der übrigen Farben liess farbige, die Schärfe des Bildes störende Zerstreuungskreise von merklicher Ausdehnung und Lichtstärke zurück, welche als „secundäres" Spectrum uncorrigirt bleiben mussten. Die Objective mit den neuen Glassorten vereinigen dagegen drei Strahlen verschiedener Farben und beseitigen dadurch

---

1) ibid. 1885, Bd. II, S. 502.

2) ibid. 1887, Bd. IV, S. 25.

3) ibid. 1886, Bd. III, S. 5.

4) ibid. 1886, Bd. III, S. 461.

5) Abbé: Sitzungsbericht der medicin. naturwissenschaftlichen Gesellschaft in Jena am 9. Juli 1886. Behrens: Zeitschrift f. w. Mikroskopie 1886, Bd. III, S. 224. Dippel: ibid. 1886, Bd. III, S. 303. Katalog von Zeiss 1888.

den störenden Rest der chromatischen Abweichung, das „secundäre“ Spectrum, und lassen nur noch einen ganz unbedeutenden, nicht mehr störenden Rest als „tertiäres“ Spectrum uncorrigirt.

Der zweite Fehler der Objective von Flint- und Kronglas besteht darin, dass bei denselben die sphärische Correction auf Strahlen einer Farbe beschränkt ist. Da die sphärische Abweichung nur für eine Farbe aufgehoben ist, besteht eine Ungleichheit der chromatischen Correction zwischen der mittleren Zone und der Randzone derart, dass die Objective, wenn die sphärische Abweichung für die mittleren Farben des Spectrums gehoben wird, für das rothe Licht sphärisch unter-, für das blaue und violette Licht aber sphärisch überverbessert erscheinen. Bei den neuen Gläsern wurde dagegen die Correction der sphärischen Aberration für zwei verschiedene Spectralstrahlen erzielt, und in Folge davon zeigt das Objectiv für die mittlere und für die Randzone denselben Grad der chromatischen Correction.

Diese Objectiv-Systeme führen eine höhere Ordnung der Achromasie herbei und werden deshalb als „apochromatische“ bezeichnet. In Folge der Beseitigung des störenden „secundären“ Spectrums und der chromatischen Differenz der sphärischen Abweichung zeigen die Bilder der neuen Objective eine viel vollkommenere Lichtconcentration im Bilde. Es ist nicht nur kein Unterschied des optischen und chemischen Brennpunktes vorhanden, sondern sie zeigen auch für die chemisch wirksamen Strahlen weder Focusdifferenz noch sphärische Abweichung, so dass das durch die chemischen Strahlen erzeugte Bild vollkommener ist als bisher. Hieraus ergiebt sich sofort, dass diese Systeme für die Mikrophotographie einen grossen Fortschritt darstellen müssen, was die neueren Aufnahmen von Zeiss[1]), C. Fränkel und R. Pfeiffer[2]) auch deutlich beweisen.

Diese optischen Verbesserungen der Objective werden noch praktisch dadurch erhöht, dass den Ocularen eine Ausgleichung, eine Compensirung eines verbleibenden oder absichtlich gelassenen

---

[1]) Carl Zeiss: Special-Katalog über Apparate für Mikrophotographie 1888.

[2]) Mikrophotographischer Atlas der Bakterienkunde. 1889 ff.

Restes der Farbendefecte zugewiesen werden konnte, so dass die ad hoc construirten neuen „Compensationsoculare“ gleichfalls einen wesentlichen Fortschritt darstellen.

Die Apochromaten gestatten nach alledem 1) die Oeffnung voll auszunutzen, so dass sie praktisch mehr leisten, als die gewöhnlichen Systeme von höherer numerischer Appertur; 2) vertragen sie eine Vergrösserung des Bildes mit sehr starken Ocularen, ohne dass Unschärfe und Lichtmangel hervortritt, so dass einerseits viel stärkere Ocularvergrössungen gebraucht werden können und andererseits in Folge dessen die Zahl der Objective verringert werden darf, weil jedes Objectiv eine Reihe sehr verschiedener Vergrösserungen zur Verfügung stellt; 3) werden die natürlichen Farben der Gegenstände gut wiedergegeben und 4) erscheinen die Bilder im ganzen Sehfelde gleichmässig farbenrein und von gleicher Schärfe, wenn natürlich auch in Folge der unvermeidlichen Krümmung der Bildfläche auch bei diesen Systemen die Einstellung zwischen Mitte und Rand etwas verschieden bleibt.

In Folge der rationellen Beziehungen zwischen Objectiven und Ocularen war es möglich, ein Compensationsocular mit $^1/_1$ Mikron-Theilung derart zu versehen, dass der Werth eines Intervalles der Theilung so viel Mikra beträgt, als die Brennweite des Objectivs in mm.[1]) Mit der Brennweite des Objectivs, welche gegeben ist, kennt man dadurch ohne jede Tabelle sofort den Reductionsfactor des Mikrometers; so ist z. B. der Werth eines Intervalles für 2 mm Brennweite 2 μ, für 8 mm ist er 8 μ.

Da die neueren Objective sowohl für homogene Immersion als die Trockensysteme viel complicirter gebaut werden müssen und ihre Vortheile nur durch die sorgfältigste Ausführung erhalten werden, sind dieselben beträchtlich theurer, als die gewöhnlichen Objective, und sie können schon deshalb leider nicht als das Arbeitsmikroskop des Praktikers in Frage kommen. Da vermuthlich nur wenige Firmen sich mit der Herstellung dieser Systeme erfolgreich beschäftigen werden, ist auch eine beträchtliche Preisherabsetzung für die

[1]) Czapski: Zeitschrift f. w. Mikroskopie 1888, Bd. 5, S. 150.

nächsten Jahre nicht zu erwarten. An der Spitze der Apochromaten stehen die von Zeiss-Jena, welche vorläufig noch als unerreicht zu bezeichnen sind. Auf dem richtigen Wege zur Construction der Apochromate sind ausserdem, soweit ich bis jetzt urtheilen kann, Powell und Lealand-London, Reichert-Wien und Seibert-Wetzlar.

Für Mikrophotographie mit den gewöhnlichen Systemen haben sich die Apparate von Klönne und Müller nach Neuhaus[1]) und Kitt[2]) bewährt, Seibert liefert den bewährten Apparat nach Fritsch und Koch, Schippang-Berlin hat in Anlehnung an den Apparat von Klönne und Müller einen Apparat nach Angaben von Israel construirt, den Stenglein[3]) empfiehlt. Zu den höchsten Leistungen scheinen aber die neuesten Zeiss'schen Apparate berufen, welche schon oben erwähnt sind.

Zur directen Beobachtung bei höherer Temperatur dienen heizbare Objecttische, bei deren Verwendung aber entweder die Condensoren in unveränderter Weise benutzbar sein müssen, wie bei dem Apparatn von Israel[4]) und dem von Vignal[5]) modificirten Ranvier-d'Arsonval'schen, oder bei denen ein besonderer Condensor angebracht wird, wie bei dem Apparate von Löwitt.[6]) Bei diesem letzteren heizbaren Objecttische ist der aus zwei Convexlinsen bestehende Condensor derart angebracht, dass der Brennpunkt des vom Spiegel und Condensor gelieferten Strahlenbündels der grösseren Höhe der feuchten Kammer entsprechend etwas höher liegt, als bei dem gewöhnlichen Beleuchtungsapparate. Auf jeden heizbaren Objecttisch, welchen man auch wählen möge, muss man sich besonders einarbeiten.

Den Unbequemlichkeiten der gewöhnlichen heizbaren Object-

---

[1]) Anleitung zur Mikrophotographie, 2. Aufl., 1888, Lehrbuch der Mikrophotographie 1890.

[2]) Oesterreichische Monatschrift für Thierheilkunde 1888, Nr. 6.

[3]) Anleitung zur Ausführung mikrophotographischer Arbeiten 1887.

[4]) Zeitschrift f. w. Mikroskopie 1885. II. S. 459.

[5]) Archives de Physiologie 1885. III. série, t. VI. p. 1.

[6]) Zeitschrift f. w. Mikroskopie 1885. II. S. 43.

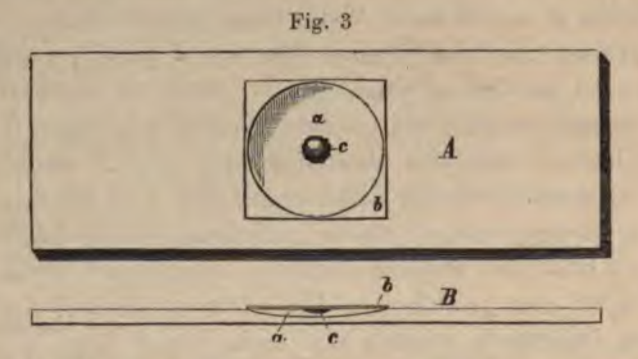
tische entgeht man aber wohl am besten, wenn man nach Sachs[1]) einen heizbaren doppelwandigen Wasserkasten anfertigen lässt, in den das ganze Mikroskop eingesetzt wird. Aehnliche Apparate haben später E. Klebs[2]) und L. Pfeiffer[3]) von Neuem eingeführt.

Für länger dauernde Beobachtungen, wie sie das Studium der Entwicklung und Keimung erfordert, ist ein Dunkelkasten nach Engelmann oder Flögel kaum zu entbehren. In einem solchen wird das mikroskopirende Auge durch Abblendung von Lichtstrahlen, welche aus der Umgebung kommen, geschützt und dadurch das Sehvermögen verschärft, aber auch das ruhende Auge wird vor störenden Lichteindrücken bewahrt, wodurch das schärfere Sehen des beobachtenden Auges indirect gefördert wird.

Zu den nothwendigen Hilfsapparaten gehören auch die **feuchten Kammern.**

Zur Orientirung über dieselben dient meist der hohle Objectträger A, B in Fig. 3; auf ein sorgfältig gereinigtes und zum Zwecke

Fig. 3



des Sterilisirens oft vorher durch die Flamme gezogenes und wieder abgekühltes Deckglas (b) wird ein flaches Tröpfchen (c) der bakterienhaltigen Flüssigkeit gebracht, das Deckglas schnell umgekehrt und mit dem nach unten hängenden Tropfen (c in Fig. B) über die Höhlung (a) gelegt und durch Vaseline, Wachs, Paraffin oder Balsam

[1]) Lehrbuch der Botanik, 4. Aufl., 1874 S. 707.

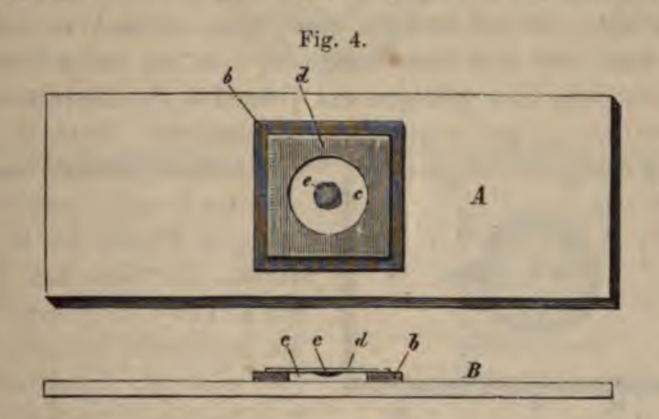
[2]) Die allgemeine Pathologie I. 1887, S. 103. Archiv für experimentelle Pathologie 1885, XX, S. 249.

[3]) Zeitschrift für Hygiene 1887, II, S. 397.

umrandet, um den Tropfen gegen Verdunstung zu schützen und das Deckglas in seiner Lage zu erhalten. Für Protozoen empfiehlt L. Pfeiffer[7]) eine von E. Leibold's Nachfolger in Köln für ihn construirte Modification, bei der hängende Tropfen und heizbarer Objecttisch vereinigt sind.

Eine andere Form stellt Fig. 4 dar. Auf dem Objectträger, A resp. B, ist eine Glasplatte (b) aufgekittet, welche einen kreis-

Fig. 4.



förmigen centralen Ausschnitt (c) hat; durch Auflegen des Deckgläschens d über diesen Ausschnitt entsteht eine Kammer, welche im Gegensatze zu dem einen Kugelabschnitt darstellenden Hohlraume von Fig. 3, von parallelen Wänden begrenzt ist. Das Tröpfchen e wird in gleicher Weise befestigt und hängt ebenso in den Hohlraum hinein. Improvisiren kann man sich diese Kammer, indem man statt des aufgekitteten Glases ein Stück entsprechend ausgeschnittene dünne Pappe, angefeuchtet, auf einen gewöhnlichen Objectträger andrückt.

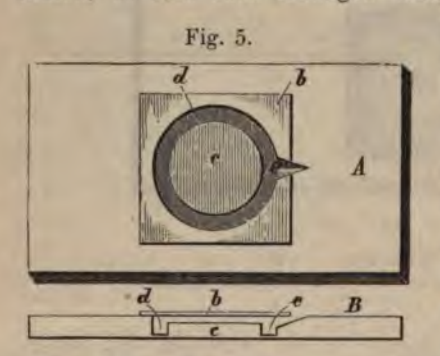
Statt der Glasplatte (b) der letzteren Figur kann man auch Glasringe von verschiedener Höhe aufkitten, besonders wenn man mit grösseren Formen arbeitet, die man schon mit schwächeren Systemen beobachten kann.

---

[7]) Die Protozoen als Krankheitserreger 1890, S. 5.

Zur Beobachtung der kleinsten Formen eignet sich noch besser der Ranvier-Prazmowski'sche [1]) Objectträger. Dieser 2,5 mm dicke Objectträger hat, Fig. 5, eine ringförmige Vertiefung d, e; die von diesem Ringe eingeschossene Kreisfläche c ist sorgfältig plangeschliffen und ihr Niveau liegt nur wenig tiefer (ca. 0,5 mm) als die Oberfläche des Objectträgers, sodass nach Auflegen des Deckglases b zwischen b und c eine dünne Flüssigkeitsschicht Platz hat. Die ringförmige Vertiefung, welche eventuell zur Aufnahme von etwas Wasser dient, verläuft entweder geschlossen, sodass keine Luft zutreten kann, oder man lässt dieselbe bei e in eine kleine Rinne verlaufen, so dass nach Auflegen und Umranden des Deckglases Luft zutreten kann. Gerade die minimale Tiefe der Flüssigkeitsschicht zwischen b und c gestattet die kleineren Formen gut zu beobachten. Zu demselben Zwecke hat Klebs [2]) einen Objectträger aus Hartgummi angegeben, bei dem unten ein Glascylinder mit flach kugeliger Oberfläche eingelassen ist, zwischen dem und dem oben aufgelegten Deckglase nur ein feiner Zwischenraum bleibt. Statt der offenen Rinne zur Luftzuführung befinden sich bei dem Klebsschen Objectträger zwei Kautschuckröhren, durch welche man Luft oder andere Gase zutreten lassen kann. Auch die Gaskammern von Stricker sind oft gut zu verwenden. Die neuerdings von Fayod [3]) eingeführten Kammern für Beobachtungen bei Luft- oder Gaszutritt oder bei Abschluss von Luft dürften wohl vielseitiger Anwendung fähig sein.

Fig. 5.



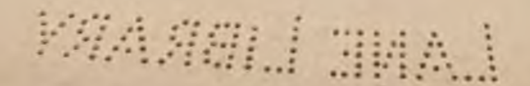
An Stelle der Objectträgerform kann man sich bisweilen vortheilhaft der v. Recklinghausen-Geissler'schen Kammern

---

1) Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bakterien-Arten 1880, S. 10.

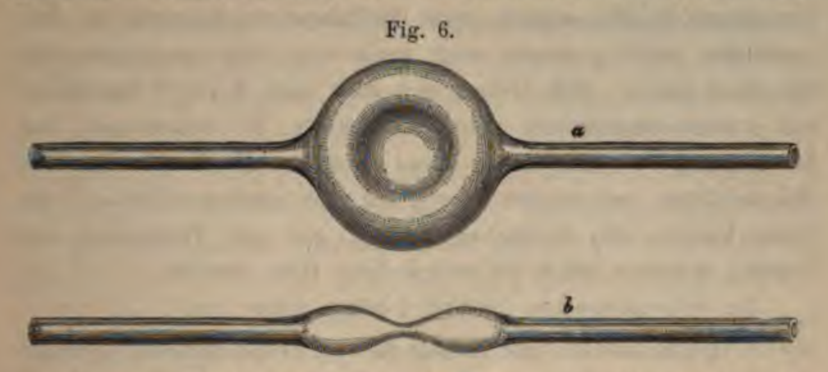
2) Die allgemeine Pathologie. 1887, S. 102.

3) Referat i. Zeitschrift f. Mikroskopie 1890, VII, S. 347.



bedienen. Bei diesen, Fig. 6, führt ein Zu- und Ableitungsrohr für Flüssigkeit, Luft oder Gase zu einem mittleren Raume aus deckglasdickem Glase, dessen Ober- und Unterseite sich in der Mitte

Fig. 6.



fast berühren (a Ansicht von oben, b von der Seite), so dass hier ein kleiner capillarer Raum vorhanden ist. Saugt man diese Kammer voll Wasser oder einer anderen Lösung, so bleibt, wenn man diese Flüssigkeiten wieder ausfliessen lässt, in der mittleren Verengung ein capillarer Tropfen hängen. Statt dieser Kammer mit capillarem Raume wandte Klebs[1]) auch solche an, deren Wände parallel liefen und welche nach der Beschreibung den später von mir vielfach mit Erfolg benutzten, von Geissler hergestellten, Fig. 7 b, ähnlich gewesen sein dürften. Dieselben werden durch Saugen mit den gewünschten Lösungen gefüllt; nach dem Ablaufenlassen des Ueberschusses bedeckt eine dünne Flüssigkeitsschicht die abwärts gekehrte, zur mikroskopischen Untersuchung bestimmte Kammerwand. Die Form, Fig. 7 a, ist von Brefeld[2]) angegeben und gleichfalls von Geissler angefertigt.

Fig. 7.



[1]) Archiv für experimentelle Pathologie. 1873, I, S. 31.

[2]) Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze. 1881, IV, S. 17.

Da die Temperatur der heizbaren Objecttische an den Stellen, welche das Thermometer direct misst, durchaus nicht mit der Temperatur der feuchten Kammern übereinstimmt und auch bei Anwendung der Wasserkasten nicht die Temperatur am Orte der Beobachtung selbst gemessen wird, muss man diese Apparate noch besonders aichen. Man bedient sich dazu nach Koch[1]) Substanzen von vorher bestimmtem Schmelzpunkte, z. B. Mischungen von Paraffin mit Vaseline, bringt etwas davon in die feuchte Kammer uud sieht nun, bei welcher Einstellung des heizbaren Tisches oder Wasserkastens, das Schmelzen erfolgt, also die Temperatur der feuchten Kammer selbst die erforderliche Höhe erreicht.

Zur mikroskopischen Technik gehören ferner von

Metallgegenständen: eine Anzahl Messer, Präparirnadeln, gewöhnliche und Schieberpinzetten. Man kann eine Schieberpinzette improvisiren, indem man über eine gewöhnliche Pinzette einen möglichst engen Korkring streift. Empfehlenswerth sind auch federnde, selbstschliessende Pinzetten mit Platinenden und zwar sowohl in gerader als über die Fläche gebogener Form der Platinenden. Ferner Spatel von Messing, Stahl oder Platin und Scheeren, sowohl gerade als über die Fläche gebogene.

Glasgegenstände: Objectträger; von diesen ist das englische Format, circa 76 mm Länge zu 26 mm Breite, mit Recht sehr beliebt. Deckgläser von verschiedener Stärke, sowohl runde als quadratische.

Neue Objectträger und Deckgläschen werden mit Wasser und darauf mit Spiritus gereinigt. Sollen die Deckgläschen für die hängenden Tropfen in der feuchten Kammer dienen, so müssen sie durch Alkohol und Aether sorgfältigst gereinigt und vor dem Gebrauche durch eine Flamme gezogen werden. Die gebrauchten Gläser legt man in verdünnte Mineralsäuren und reinigt sie durch warmes Wasser bis zum Verschwinden der sauren Reaction, um sie dann ev. wie die neuen noch mit Spiritus zu behandeln.

Zum Uebertragen der Präparate in die verschiedenen Lösungen sind sogenannte Krystallisationsschalen verschiedener Grösse, Uhr-

---

[1]) Cohn's Beiträge zur Biologie der Pflanzen. II, S. 284.

schälchen und Glasklötzchen mit einem Ausschliffe, sog. Salzfässchen oder Blockschälchen, erforderlich. Für viele Fälle eignen sich die Siebdosen von Steinach.[1])

Zum Anfertigen von Lösungen gehören Bechergläser, Kölbchen, Glastrichter, Maasscylinder, Büretten, Pipetten und Glasröhren, von denen man sich einige an einem Ende zu Capillaren auszieht. Glasstäbe verschiedener Stärke und Länge; in einige Glasstäbe von circa 15 cm Länge werden an einem Ende unter Erweichen des Glases in der Flammn 3 bis 5 cm lange Stückchen Platindraht verschiedener Stärke eingeschmolzen, indem man das glühend gemachte Ende des Drahtes etwa 0,5 cm tief in das erweichte Ende des Glasstabes einstösst. Den Platindraht lässt man z. Th. gerade, z. Th. biegt man das freie Ende rechtwinkelig oder zu einer Oese.

Zum Bezuge der Utensilien für Mikroskopie kann man sich an folgende Firmen wenden: Boecker-Wetzlar, König-Berlin, Klönne und Müller-Berlin, welche auf Verlangen auch andere, nicht besonders angeführte Utensilien besorgen; speciell für Glassachen ausserdem noch: Stender-Leipzig, Warmbrunn, Quilitz & Co.-Berlin, Vogel-Giessen.

---

3. Nachweis der Bakterien im ungefärbten Zustande.

Die älteste Methode besteht darin, dass man ein Tröpfchen einer bakterienhaltigen Flüssigkeit auf den Objectträger bringt und ein Deckelglas darauf legt. Sollen Bakterien, welche auf festen Substraten gewachsen sind, derartig untersucht werden, oder sind die Bakterien in und auf den Flüssigkeiten in derberen Anhäufungen, Zoogloeen oder Membranen, vorhanden, so nimmt man mit einem Platindraht eine kleine Spur dieses Materials und verreibt und vertheilt es in einem Tröpfchen Flüssigkeit. Hierzu wählt man entweder destillirtes Wasser oder eine indifferente 0,5 %ige Kochsalz-

[1]) Zeitschrift f. w. Mikroskopie. 1887, IV. S. 433.

lösung; in besonderen Fällen kann man auch Serum oder Bouillon dazu verwenden. Man muss in jedem derartigen Falle nach dem früher Gesagten zunächst mit Blenden untersuchen, weil das Structur- oder Diffractionsbild zur Beobachtung kommt.

Bei dieser Art der Beobachtung der Bakterien in einer Flüssigkeitsschicht zwischen Objectträger und Deckglas ohne besondere Präparation, macht sich sofort eine Unsicherheit dadurch bemerkbar, dass fast alle Bakterien in Bewegung sind. Zum Theil scheinen es spontane Bewegungen zu sein, zum Theil ist es einfach die sogenannte Brown'sche Molekularbewegung, wie bei allen in Flüssigkeiten suspendirten feinsten Partikeln. Wegen der Kleinheit der Objecte erschweren diese Bewegungen das genaue Beobachten, so dass man entweder warten muss bis von selbst etwas Ruhe im Tropfen eingetreten ist, oder dass man künstlich die Bewegungen verringert oder aufhebt. Das letztere ist schon vor langer Zeit erfolgreich versucht worden durch „Narcotisiren“ der Mikroorganismen [1]), indem man mit einer Nadelspitze eine Spur Opium, Weingeist oder verdünnter alkoholischer Jodtinctur zum Wassertropfen unter dem Deckglase hinzusetzte. Etwas besser erreicht man ein derartiges Fixiren durch Narcotisiren, indem man vom Rande des Deckglases her einen Tropfen concentrirter Sublimatlösung hinzutreten lässt, der sich langsam unter dem Deckglase ausbreitet. Auch manche Anilin-Farben wirken narcotisirend. Noch besser eignet sich das Austrocknen zum Fixiren; da diese Methode aber vorwiegend als Vorbereitung zur Färbung in Frage kommt, soll sie erst später besprochen werden.

Von anderen Mikroorganismen bereiten besonders die einzelligen, amoeboiden Formen durch ihre Beweglichkeit oft grosse Schwierigkeiten. Man kann diese Formen durch Unterbringen geeigneter Nahrung zwischen Objectträger und Deckglas zum zeitweiligen Einstellen der Bewegungen veranlassen, wie Brass [2]) mit Erfolg versuchte: „Da die meisten Protozoen äusserst beweglich sind, so lange sie Hunger haben, thut man gut, sie mit zerriebenen Pflanzentheilchen u. s. w. vorher ordentlich zu füttern; dann verharren sie während

---

[1]) Perty, Zur Kenntniss kleinster Lebensformen. 1852, S. 13.

[2]) Zeitschrift f. w. Mikroskopie. 1884, I, S. 40.

der Untersuchung meist nach kurzer Zeit ruhig an einer Stelle und beginnen alsbald die aufgenommenen Nahrungsmitteln zu assimiliren. Jetzt kann man auch mit stärkeren Systemen arbeiten, ohne allzuhäufig durch die plötzliche Fortbewegung der betreffenden Objecte gehindert zu werden." Amoeboide Formen reagiren bei vielen Zusätzen durch Formveränderungen, Einziehen der Fortsätze; in solchen Fällen wird das Narcotisiren am besten mit Sublimat oder mit 1%, durch Natriumcarbonat neutralisirte Lösungen von salzsaurem Hydroxylamin[1]) bewirkt. Die Lösung derartiger Mittel muss mit dem Medium geschehen, in dem sich die Mikrobien spontan befinden, z. B. Brunnenwasser oder Seewasser, nicht mit destillirtem Wasser.

Sollen Bakterien oder andere Mikroorganismen absichtlich unter ganz natürlichen Verhältnissen beobachtet werden, wie es zur Controlle anderer Methoden und zur vollen Kenntniss ihrer Biologie und Morphologie durchaus nothwendig ist, so benutzt man besser die früher angegebenen feuchten Kammern, in denen man einen hängenden Tropfen, c in Fig. 3 A u. B, e in Fig. 4 A u. B in der dort angegebenen Weise bildet. Zur Herstellung desselben nimmt man direct einen Tropfen der bakterienhaltigen Flüssigkeit oder man bringt in das vorher aufgetragene Tröpfchen von Wasser, Kochsalzlösung, Bouillon etc. am Rande mit Platindraht eine Spur des Bakterienmaterials; man „impft" den Tropfen.

Das Einstellen und Beobachten der auf dem Objectträger, in einem Medium unter Deckglas liegenden Objecte erfolgt nun in folgender Weise:

1. Das Praparat wird so auf den Objecttisch gelegt, dass die Mitte des Deckgläschens (oder bei ungleichmässiger Präparation eine besonders auffallende Stelle desselben) in die optische Axe des Mikroskopes fällt.
2. Unter Entfernung jeder Blendung wird der Planspiegel so nach der Lichtquelle dirigirt, dass das Gesichtsfeld beleuchtet ist.
3. Bei Benutzung der homogenen Immersion bringt man ein Tröpfchen Oel auf die central liegende Stelle des Deckgläschens.

---

[1]) Hofer, Zeitschrift f. w. Mikroskopie. 1890, VII, S. 318.

4. Dann schraubt man mit dem Trieb zur groben Einstellung oder, bei Fehlen desselben, durch schraubende Bewegung des Tubus mit der Hand den Tubus des Mikroskopes so weit herunter, dass die Frontlinse des Objectivs eben in das Oel eintaucht. Manche Beobachter ziehen es vor das Oeltröpfchen nicht auf das Deckglas, sondern auf die Frontlinse zu bringen und andere bringen je ein entsprechend kleineres Oeltröpfchen auf Deckglas und Frontlinse.
5. Mit Rücksicht auf das Structurbild wird jetzt die Blende möglichst eng gewählt und
6. Durch Stellen des Planspiegels und event. Heben oder Senken des Condensors die Beleuchtung maximal gemacht.
7. Da bei richtiger Wahl der Grösse der Oeltropfen nach 4) das Bild eben anfängt sichtbar zu werden, so bleibt von jetzt ab der grobe Trieb ausser Gebrauch und die definitive Einstellung erfolgt mit der Mikrometerschraube. War die Grösse des Oeltropfens nicht richtig getroffen, so muss man vor Gebrauch der Mikrometerschraube noch mit dem groben Trieb durch Heben oder Senken so weit nachhelfen, dass das Bild eben anfängt sichtbar zu werden. Man hat sich jedoch davor zu hüten, dass die Frontlinse jemals auf das Deckglas anstösst!

Zur Beobachtung bedient man sich zunächst stets des schwächsten Oculars, welches auch das Einstellen sehr erleichtert; oft ist es sogar rathsam überhaupt sich erst mit schwächeren Trocken-Systemen zu orientiren und dann erst zur Immersion überzugehen.

Bei dem hängenden Tropfen ist es besser, wenn man das System auf den Rand des Tropfens einstellt und dabei das Objectiv unter genauer Beobachtung von der Seite her bis fast zur Berührung des Deckgläschens herunterbewegt. Das Object liegt in diesen Fällen etwas tiefer als sonst und es ist deshalb, sowohl um ein Beschädigen der Objective als das Zerbrechen von Deckgläsern zu vermeiden, gerathen, die genaue Einstellung durch Aufwärtsbewegung des vorher etwas zu tief eingetauchten Objectivs zu bewirken, statt durch die während des Hineinblickens erfolgende und schwerer controllirbare Abwärtsbewegung des nur eben eintauchenden Objectivs sowohl

Objectiv als Deckglas zu riskiren. Nach dem Gebrauche wird das an der Frontlinse hängende Oel mit einem feinen Leinwandläppchen (weniger gut mit Fliesspapier) sorgfältig abgetupft und das System in die zugehörige Messingkapsel eingeschlossen, wenn eine längere Pause eintreten soll.

Für andere Fälle eignen sich die anderen feuchten Kammern besser und die in Fig. 5 angegebene Form wurde besonders von Prazmowski zu Studien über Bildung und Auskeimung endogener Sporen benutzt. Da in dieser dünnen Flüssigkeitsschicht in den verschiedenen Zonen verschiedene Sauerstoffspannung besteht, eignen sich diese Kammern auch um über gewisse Grade des Sauerstoffsbedürfnisses einen orientirenden Aufschluss zu erhalten: einzelne Arten bevorzugen den Rand, andere die Mitte und besonders nach Engelmann einige Schraubenformen eine zwischenliegende Schicht.

Bei den Kammern der Fig. 6 muss die aufzusaugende Flüssigkeit so viele Keime enthalten, dass etwa jeder Tropfen einen Keim enthält; dann kann man darauf rechnen, dass auch der hängenbleibende capillare Tropfen einen Keim enthält, dessen Schicksal man in Folge dieser Fixirung an der engsten Stelle beobachten kann. Bei der Fig. 7 bedeckt eine ganz feine Flüssigkeitsschicht die eine Kammerwand und die Fixirung der Keime erfolgt gerade durch diese Reduction der Menge der umgebenden Flüssigkeit, wodurch einerseits die Bewegungen sehr herabgesetzt oder aufgehoben werden, während andererseits die Menge der umgebenden Nährlösung doch für die Entwickelung ausreicht.

Zur Orientirung genügt der hängende Tropfen und sowohl bei den hierzu dienenden feuchten Kammern, Fig. 3, als ev. auch bei der älteren Präparation zwischen gewöhnlichem Objectträger und Deckglase ist es für amoeboide Mikroorganismen nach Brass und Zopf empfehlenswerth, kleine grüne Algen unter das Deckglas zu bringen, welche bei Lichtzutritt so viel Sauerstoff bilden, um das Leben der Amoeboiden, Infusorien etc. längere Zeit zu unterhalten.

Soll ein mit Oelimmersion beobachtetes Deckglaspräparat conservirt oder anderweitig weiter behandelt werden, so wird zunächst das Oel vom Deckglase durch Fliesspapier abgesaugt und abgewischt

und ein Rest muss manchmal noch mit Chloroform oder Benzin entfernt werden.

Ungefärbte Bakterien sind bis jetzt als Dauerpräparate nicht in Gebrauch gekommen und ebenso ist es in der Regel bei den amoeboiden Formen gewesen. Will man den Versuch machen, diese Formen in ungefärbtem Zustande zu conserviren, so muss man dieselben zuerst langsam abtödten und dadurch die Formen in möglichst natürlichem Zustande fixiren. Für Bakterien, aber auch für einige Amoeboide kann dies durch concentrirte Sublimatlösung geschehen. Für Amoeboide empfiehlt Brass als Regel das tropfenweise seitliche Zutretenlassen einer Lösung von: Chromsäure 1, Platinchlorid 1, concentrirte Essigsäure 1 und 400 bis 1000 Wasser. Nach O. E. R. Zimmermann's privater Mittheilung lässt man, sobald etwas Wasser verdunstet ist, seitlich zwischen Objectträger und Deckgläschen einen Tropfen folgender Mischung zutreten. In 100 ccm Wasser werden 0,5 g Chromsäure und 0,25 g Sublimat gelöst; von dieser Lösung nimmt man jedesmal 5 ccm, denen a) 2 bis 3 Tropfen einer 5%igen Essigsäure zugesetzt werden; statt der Essigsäure können auch zu 5 ccm der Chromsäure-Sublimatlösung b) 2 Tropfen einer 10%igen Platinchloridlösung zugefügt werden. Auch Hydroxylamin (S. 55) dürfte sich eignen.

Die conc. Sublimatlösung und jede dieser verschiedenen Mischungen haben für einzelne Formen besonderen Werth, so dass man bisweilen zum Probiren gezwungen ist; doch ist es besonders mit diesen Mischungen möglich, auch die empfindlichsten Formen ohne auffallende Aenderungen zu conserviren. Die Fixirung ist je nach der Schnelligkeit des Eindringens in etwa 5 bis 10 Minuten beendigt. Die Fixirungen durch einige Secunden langes Einwirken einer 1%igen Osmiumsäurelösung oder durch mindestens 5 Minuten lange Einwirkung von Alkohol ist weniger zu empfehlen.

Vielleicht gewinnt eine andere Art der Alkoholhärtung, welche von F. E. Schulze[1]) angegeben ist, in Zukunft neben den Fixirungen durch Sublimat und die angeführten Mischungen Bedeutung, besonders da sie überhaupt für das Studium empfindlicher, durchsichtiger

---

[1]) Arch. f. mikroskop. Anatomie. Bd. 26, S. 539.

Formen sehr geeignet ist, welche durch Metschnikoff's Untersuchungen über die Krankheiten der Daphnien für Fragen der allgemeinen Parasitologie sehr wichtig geworden sind. In ein grösseres Gefäss, dessen Boden mit einer Schicht geglühten Kupfervitriols versehen ist, kommt eine verhältnissmässig grosse Menge absoluter Alkohol; in dieses Gefäss taucht ein zweites kleineres, dessen Boden durch eine feine Papiermembran ersetzt ist. In diesen Dialysator bringt man die zu härtenden Organismen mit einer relativ geringen Menge ihrer natürlichen Flüssigkeit oder mit etwas indifferenter Kochsalzlösung. In Folge des Austauschs zwischen Flüssigkeit und absolutem Alkohol durch die Membran hindurch kommen die Organismen verhältnissmässig sehr schnell und doch äusserst schonend in einen zur Fixirung der Form und zur Conservirung geeigneten, fast absoluten Alkohol.

Gewöhnlich dient diese Behandlung als Vorbereitung zu Kern- und anderen Färbungen, nach deren Gewinnung erst die Dauerpräparate hergestellt werden. Will man diese Formen aber ungefärbt conserviren, so kann man versuchen sie nach Tödtung und Fixirung der Formen durch Sublimat, Alkohol oder die angegebenen Mischungen in Glycerin, Glycerin-Gelatine oder Balsam zu conserviren.

Zu diesem Zwecke wird das überflüssige Fixirungsmittel einige Minuten durch Wasser ausgewaschen; will man unter dem Deckglase präpariren, so lässt man das Wasser an der ursprünglichen Eintrittsstelle des Fixirungsmittels eintreten, während man auf der anderen Seite ein zum Absaugen dienendes Stück Fliesspapier anlegt. Dann lässt man zum allmählichen Entwässern je einige Minuten lang 50 %, dann 70 %, 90 % und schliesslich absoluten Alkohol einwirken. Nach Absaugen oder Verdunsten des Alkohols folgt Xylol und Einschluss in Xylol-Canadabalsam. Bei Fixirung durch absoluten Alkohol unterbleibt selbstverständlich das Auswaschen und es folgt sofort Xylol und Balsam. Nach Schulze kann man die Ueberführung aus Alkohol in Balsam auch durch spontanes langsames Senken erzielen in einem Gefässe, welches zu unterst eine Lösung von Canadabalsam in Xylol, darauf eine Schicht reines Xylol enthält und auf diese letztere bringt man den absoluten Alkohol mit den überzuführenden Organismen. Nach eingetretener Senkung in den Balsam werden Xylol

und Alkohol abgelassen. Soll das Präparat in Glycerin oder Glyceringelatine conservirt werden, so setzt man zu dem absoluten Alkohol zuerst 50 % Glycerin und führt das Präparat allmählich in reines 50 % iges wässriges Glycerin über. Hierin kann es direct conservirt werden oder man ersetzt das Glycerin durch Glyceringelatine.

Derartige Conservirungen ungefärbter und frischer Präparate sind am meisten und erfolgreichsten bei Pilzen und Pilz-Schnitten üblich, wie sie z. B. Zimmermann bei seinen schönen Präparaten anwendet. Auf den Objectträgern werden am Drehtische niedrige cylindrische Zellen angefertigt. Das Material zu den Zellen wird durch Auflösen von Schellack in Alkohol gewonnen; nach dem Lösen wird filtrirt, dann wieder eingedickt bis sich die Masse im Pinsel zu Zellringen verwenden lässt, ohne breit zu laufen. Diesem Lack setzt man am besten noch ein Paar Tropfen Ricinusöl zu, damit er nicht zu spröde wird. Eine solche Zelle, welche mindestens einen Tag alt sein muss und die man sich am besten in Vorrath hält, wird mit 50 % Glycerin in Wasser in geringem Ueberschuss angefüllt. Darauf bringt man das fertige Object hinein, legt das Deckglas auf, erwärmt den Objectträger etwas und drückt das Deckglas fest. Nach Abwaschen des herausgedrückten überschüssigen Glycerins mit kaltem Wasser setzt man auf den Zellring einen Ring von farbigem Lack, der das aufgesetzte Deckglas mit umfasst. Der farbige Lack wird durch Auflösen einer grünen Anilinfarbe in dem filtrirten Lack hergestellt.

Bakterien im Gewebe ohne Färbung zu erkennen und besonders der kleinsten kugeligen, mit körnigem Gewebs-Detritus leicht zu verwechselnden Formen zu differenziren, gelang v. Recklinghausen [1], indem er die Bakterien ausgezeichnet fand „durch ihr gleichmässiges Korn und durch ihre fast vollständige Unveränderlichkeit in Essigsäure, Glycerin, selbst Natronlauge“. In ähnlicher Weise machte Friedländer die bereits anderweitig nachgewiesenen Bakterien des Abdominaltyphus in Schnitten sichtbar und Baumgarten [2]) vermochte

---

[1]) Verhandlungen der physikal-medicin. Gesellschaft in Würzburg N. F. II. Bd. Heft 4, 1872. — Sitzungsbericht S. 12.

[2]) Centralblatt f. d. med. Wissenschaft 1882, No. 15.

Tuberkelbacillen, welche er durch Färbungen nach den damals üblichen Methoden nicht sichtbar machen konnte, durch ihre Resistenz gegen verdünnte Kalilauge in Schnitten nachweisen. In Geweben sind aber diese Mittel unzureichend und es bedarf mindestens der nachgewiesenen Resistenz gegen Säuren und Alkalien. So fand z. B. Paneth[1], dass die Körnchenzellen im Fundus der Lieberkühnchen Drüsen gegen Kalilauge resistent sind, in denselben etwas schrumpfen, härtere Conturen bekommen und dadurch kokkenähnlicher werden, dass sie sich aber in Säuren schnell und auf die Dauer lösen. Die besonders in Epithelien eingeschlossenen Mikroparasiten anderer Gruppen müssen ebenfalls oft in ungefärbtem Zustande mit und ohne diese Reagentien untersucht werden.

Dauerpräparate von Mikroorganismen sind zu beziehen durch Boecker-Wetzlar, Klönne und Müller-Berlin, Kornfeld-Berlin, Dr. O. E. R. Zimmermann-Chemnitz.

---

4. Allgemeines über Farben und Färben.

Litteratur.

Dekhuizen: Ueber die Tinction. Centralblatt f. d. med. Wissenschaften. 1886, No. 51 u. 52.

Flesch: Bemerkungen zur Kritik der Tinctionspräparate. Zeitschrift f. w. Mikroskopie. 1885, II, S. 464.

Gierke: Färberei zu mikroskopischen Zwecken. ibid. 1884, I; 1885, II und Separat.

Griesbach: Weitere Untersuchungen über Azofarbstoffe, behufs Tinction menschlicher und thierischer Gewebe. ibid. 1886, III, S. 358; 1887, IV, S. 433; 1888, V, S. 314.

Goppelsröder: Ueber Capillar-Analyse, Wien, 1889.

Nasse: Absorptionsanalyse. Referat in Zeitschrift f. w. Mikroskopie. 1890, VII, S. 350.

Plaut: Färbungs-Methoden zum Nachweis der fäulnisserregenden und pathogenen Mikroorganismen. 2. Aufl. 1885.

Unna: Die Entwickelung der Bakterienfärbung. Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde. 1888, No. 1 bis 11 und Separat.

[1]) Arch. f. mikroskop. Anatomie 1888, Bd. 31, S. 177.

Specielle Litteratur über Anilinfarben.

Schulz: Die Chemie des Steinkohlentheers mit besonderer Berücksichtigung der künstlichen organischen Farbstoffe. 2. Aufl. 1886/88.

Schultz & Julius: Tabellarische Uebersicht der künstlichen organischen Farbstoffe. 1888.

Neisser: Fortschritte d. Medicin 1889, VII, No. 21 und Verhandlungen des 1. Congresses der deutschen dematologischen Gesellschaft. 1889, S. 29.

Nietzki: Organische Farbstoffe. 1886.

Unna: Die Rosaniline und Pararosaniline. 1887.

Witt: Zur Theorie der Färbeprozesse. Referat in Chem. Centralblatt. 1890, II, No. 23.

Bereits im vorigen Jahrhundert begegnen wir Versuchen, Färbungen zu morphologischen Studien anzuwenden und G. C. Reichel[1]) benutzte 1758 das verschiedene Verhalten der Gewebselemente der Pflanzen gegen das Absud des Fernambukholzes systematisch zum Auffinden der Gefässe. Aber erst seit Hartig (1854), Gerlach (1858) und Maschke (1859) durch systematische Anwendung des Karmins in der histologischen Technik gezeigt haben, dass durch Anwendung von Farben bestimmte Bestandtheile von Geweben deutlicher erkannt und von anderen Bestandtheilen differenzirt werden können, betrachtet man die Färbungen als Aequivalent chemischer Reactionen. Weigert[2]) gelang es zuerst Kokken-Zoogloea durch Anwendung von kernfärbendem, ammoniakalischem Karmin und Nachbehandlung mit Salzsäure-Glycerin neben den Kernen zu färben. Die Färbung war zwar zuerst von Weigert als Färbung der Zwischensubstanz aufgefasst worden, was von ihm später berichtigt wurde, aber es war hiermit der Weg gezeigt, die Bakterien nicht nur negativ, durch ihre grössere Resistenz gegen Säuren und Alkalien, zur Anschauung zu bringen. Im folgenden Jahre gelang es Eberth und Wagner Kokken, nicht aber Bacillen, mit Hämatoxylin zu färben. Dann ermittelte Weigert,[3]) dass sich Kokken, besonders in Zoogloea, durch verschiedene Kernfärbemittel färben liesen; zu diesem Zwecke benutzte er damals zuerst eine

---

[1]) Holzner: Zur Geschichte der Tinctionen. Zeitschrift f. w. Mikroskopie 1884, I, S. 254.

[2]) Ueber Bakterien in der Pockenhaut. Centralblatt f. d. med. Wissenschaft 1871, No. 49.

[3]) Sitzung der Schlesischen Gesellschaft für vaterländische Cultur, vom 10. December 1875.

kernfärbende Anilinfarbe, das Methyl-Violett. Durch Nachbehandlung der mit Hämatoxylin gefärbten Präparate, in denen Kokken und Kerne blau gefärbt waren, mit verdünnter Kalilauge und starker Essigsäure gelang Weigert zuerst eine isolirte Färbung der Kokken. Weiter beobachtete Weigert[1]), dass grössere Bacillen, welche durch Hämatoxylin nicht gefärbt wurden, durch gewisse Anilinfarben kenntlich gemacht werden können. Bald darauf fand Koch,[2]) dass die Bakterien die Anilinfarben mit einer solchen Sicherheit so schnell und so reichlich aufnehmen, „dass man diese Farben als Reagens zur Unterscheidung der Bakterien von krystallinischen und amorphen Niederschlägen auch von feinsten Fetttröpfchen und anderen kleinsten Körpern benutzen kann". Die isolirte Färbung der Bakterien gelang Koch[3]) durch Auswaschen der Schnitte mit kohlensaurem Kali, wobei sich alle Bestandtheile ausser den Bakterien entfärbten. Schlieslich gelang es Weigert[4]), Doppelfärbungen zu erzielen, indem er die mit blauen Anilinfarben behandelten Präparate mit kernfärbendem Pikrokarmin nachbehandelte, wodurch die Bakterien blau und die Kerne roth erschienen, und Koch[5]) gelang es, eine bestimmte Bakterienart anders zu färben als die Kerne und die übrigen gleichzeitig vorhandenen Bakterien.

Welche Farben soll man zur Bakterienfärbung wählen? Weigert's Beobachtung, dass sich die Kokken, nicht aber die Bacillen, in Karmin färben, die ähnliche Beobachtung von Eberth und Wagner über das Hämatoxylin schienen nach Weigert zuerst durchgreifende chemische Differenzen zwischen den einzelnen Formgruppen von Cohn anzudeuten. Auch Safranin, eines der besten Mittel zum Studium der Kerne, ist für Kokken besser als für die übrigen Bakterien verwerthbar. Weiter ermittelte Ober-

---

[1]) Berl. klin. Wochenschrift 1877, No. 18/19. und Bericht über die Münchener Naturforscherversammlung 1877, S. 283.

[2]) Verfahren zur Untersuchung, zum Conserviren und Photographiren der Bakterien. Beiträge zur Biologie der Pflanzen. Bd. II, 3. Heft 1877, S.. 399

[3]) Wundinfectionskrankheiten. 1878, S. 39.

[4]) Zur Technik der mikroskopischen Bakterienuntersuchungen. Virchow's Archiv 1881, Bd. 84, S. 275.

[5]) Berl. klin. Wochenschrift 1882, No. 15.

meyer[1]), dass die Spirochäten gegen Säuren und Alkalien weniger resistent sind als die übrigen Bakterien. Aber diese Differenzen sind keine durchgreifenden, da es Kokken und Bacillen gibt, welche Alkalien und Säuren gegenüber weniger resistent sind als andere, da es Bacillen gibt, welche sich mit Hämatoxylin eben so gut oder eben so schlecht färben wie Kokken. Dagegen haben sich sowohl für die Deckglas-Trockenpräparate als für die Schnitte **die basischen Anilinfarben** als unter allen Umständen brauchbare Farben erwiesen, so dass wir dieselben in erster Linie zur Bakterienfärbung verwerthen und andere Farben vorwiegend zu secundären Zwecken anwenden. Für die Mikrobien und Mikroparasiten anderer Gruppen erweisen sich die Anilinfarben weniger geeignet, während Karmin nnd besonders Hämatoxylin zu denselben brauchbar sind.

Ehrlich[2]) unternahm es dann, zum Theil in Verbindung mit seinen Schülern Schwarze und Westphal, die Farben der mikroskopischen Technik zu klassificiren. Der Ausganspunkt dieser farbentheoretischen Studien ist die Beobachtung, dass die verschiedenen Bestandtheile der Gewebe und Zellen die Fähigkeit besitzen, bestimmte Farben allein aufzunehmen oder mit grösserer Hartnäckigkeit festzuhalten als andere Gewebselemente. Diese „Election", diese Verwandschaft der Farben zu gewissen Elementen verleiht den Färbungen den Werth chemischer Reactionen oder, wie es zunächst unbefangener heissen sollte, zeigt in Ermangelung chemisch präcise definirbarer Reactionen dem Auge das Vorhandensein von sonst nicht oder schwer wahrnehmbaren Differenzen an. Manche Farben färben von vornherein nur bestimmte Elemente, andere Farben färben zunächst viele verschiedenartige Bestandtheile eines Gewebes ganz diffus, so dass Einzelheiten nicht genügend zu erkennen sind. Lässt man dann in derartigen Fällen gewisse Extractionsmittel der Farben einwirken, so entziehen diese einzelnen Elementen die Farbe wieder, während andere Elemente trotzdem die Farbe hartnäckig festhalten.

1) Berl. klin. Wochenschrift 1873, S. 391.

2) Zeitschrift für klin. Medicin, Bd. I, 1880, S. 553, und kleinere gelegentliche Mittheilungen.

Schwarze: Ueber eosinophile Zellen, Dissert. Berlin 1880.

Westphal: Ueber Mastzellen. Dissert. Berlin 1880.

In diesen Fällen wird die Möglichkeit „gewisse Elemente ad maximum zu färben, alles Andere aber möglichst ungefärbt zu lassen" erst durch einen Umweg erreicht. Ehrlich nannte diese von Friedländer[1]) bei anderer Gelegenheit zuerst angewandte indirecte Methode das „Princip der maximalen Entfärbung".

Histologisch muss man bei den Beziehungen zwischen Mikroorganismen, Gewebselementen und Farben an jedem Farbstoffe zwei Eigenschaften auseinander halten: 1. die Election, die Verwandtschaft zu gewissen Elementen und 2. die tinctoriale Kraft.

In Bezug auf die Election theilte Ehrlich die Anilinfarben in zwei Gruppen: a) die saueren, b) die basischen Anilinfarben, je nachdem das färbende Princip die Säure oder die Farbbase ist; in diesem histologischen Sinne ist es gleichgültig, ob die Säure als freie Säure oder als Salz und ebenso ob die Base als solche oder als Salz zur Anwendung kommt.

Die Körper der ersten Gruppe zeigen sämmtlich dieselben electiven Eigenschaften, d. h. sie wirken als Farbsäuren und tingiren alle diese zugänglichen Elemente, aber in verschiedenem Grade der Intensität. Ebenso zeigen die basischen Anilinfarben dieselben electiven Eigenschaften, indem sie die den basischen Farben zugänglichen Elemente färben; aber auch bei ihnen ist die Intensität der Färbung eine differente. Diese Intensität der Färbung wird bedingt durch die tinctoriale Kraft und diese beruht wesentlich darauf, dass die verschiedenen Farbstoffe der einzelnen Gruppen gegenüber Extractionsmitteln wie Wasser, Alkohol, Essigsäure, Glycerin in verschiedenem Grade von den Gewebs- resp. Zellelementen zurückgehalten werden.

Die Ausdrücke Election und tinctoriale Kraft sind zunächst nur Umschreibungen von thatsächlichen Beobachtungen, aber nicht ohne Weiteres Erklärungen der Beobachtungen. In den letzten Jahren haben vielfach Meinungsverschiedenheiten darüber geherrscht, ob die histologischen Färbungen durch chemische oder physikalische Processe zu Stande kommen. Ich selbst habe von der 1. Auflage an der

---

[1]) Studien über automatische Herzbewegung; in: Untersuchungen aus dem physiologischen Institut zu Würzburg, I, 1867.

chemischen Auffassung das Wort geredet und in diesem Sinne scheint sich die Sache auch im Allgemeinen zu entscheiden. Bei der Wahl der Färbemethoden und bei dem weiteren Ausbau der histologischen Methodik ist eine gewisse Rücksichtnahme auf diese Grundfragen für Lehren und Lernen unerlässlich und ich will deshalb in aller Kürze einige der wichtigeren Argumente für die physikalische und chemische Auffassung im Zusammenhang entwickeln. Bei den heftigen Gegensätzen in den Anschauungen ist mitten in der Ausarbeitung dieses Gebietes an eine Alle befriedigende Darstellung kaum zu denken und ich kann nur versuchen, die Gründe für und gegen die beiden Ansichten gegeneinander abzuwägen.

Zweifellos spricht für die Mitwirkung physikalischer Processe, dass der physikalische Zustand der Gewebe auf den Verlauf und Ausfall der Färbung von Bedeutung ist. Ein natürliches, feuchtes Gewebsstück färbt sich wenig oder auch gar nicht, während ceteris paribus das durch Chemikalien, wie Alkohol, oder durch Trocknen wasserarme sich intensiv färbt. Im feuchten natürlichen Gewebe sind die natürlichen Interstitien und Poren bereits mit Flüssigkeit gesättigt, während im tockenen Gewebe in die lufthaltigen intermolekularen Interstitien der Strom der Farblösung eindringt und sie zum Quellen bringt. Die Imbibition muss sich je nach der vorausgegangenen Behandlung geltend machen und zwar muss sie so lange anhalten, bis alle Interstitien gefüllt sind. Hierin liegt der Werth des Antrocknens am Deckglase und der vorgängigen Behandlung der Schnitte, welche immer in letzter Instanz darauf hinausläuft, durch chemisches Entwässern, besonders durch absoluten Alkohol, oder durch Austrocknen gleiche physikalische Grundlagen zu schaffen.

Da die Farben der histologishen Technik sämmtlich krystalloide Stoffe sind, müssen sie sich nicht nur bei der Imbibition wie Salzlösungen verhalten, sondern auch dann, wenn zwei Flüssigkeitsmassen durch eine Membran getrennt sind. In diesem Falle gehen so lange Diffusionsströme durch die Interstitien und Poren der Membran, bis auf beiden Seiten gleiche Lösungen hergestellt sind, bis eine physikalische Sättigung eingetreten ist. Auf die Intensität und Richtung der Diffusionsströme hat nicht nur die physikalische Be-

schaffenheit der Membranen im engeren Sinne, sondern überhaupt die Grösse und Anordnung der Poren und Interstitien und ausserdem vor Allem die Temperatur Einfluss. Bei gleicher Farblösung, aber ungleicher Anordnung der Interstitien oder der Membranen muss in Folge der Endosmose, selbst bei gleicher chemischer Beschaffenheit eine Differenz in der Schnelligkeit nnd Intensität der Färbung vorhanden sein.

In der Regel werden sich die Imbibitions- und Diffusionserscheinungen gleichzeitig bemerkbar machen. Es tritt eine Imbibition mit der Farbflüssigkeit, d. h. eine Quellung des vorher wasserberaubten Gewebes ein. Dabei werden aber die Anordnung der Interstitien und besondere trennende Membranen in einigen Theilen ein intensiveres Eindringen, also auch intensiveres Färben bewirken und in demselben Maasse müssen sich Differenzen in der Concentration der gesammten inneren Farblösung und der von aussen eindringenden Farblösung emtstellen.

Für die Bedeutung der Capillaren als Interstitien sprechen auch folgende Thatsachen, welche Differenzen in der Intensität der Färbung begreiflich machen. Goppelsröder hat nachgewiesen, dass in Farblösungen eintauchende capillare Substanzen wie Fliesspapier die verschiedenen Farben verschieden hoch heben und sich dabei in oft charakteristischer Weise färben, so dass er bisweilen auf diese Weise eine Trennung, eine „Capillar-Analyse" verschiedener Farben bewirken konnte. Nasse gelang dasselbe, als er Methylviolett auf Quarzpulver einwirken liess. Dabei haftete der Farbstoff dem Quarz so fest an, dass er sich selbst durch langes Auskochen mit Wasser nicht ganz entfernen liess. Da die Farbstofftheilchen ihren Sitz in den Spalten der Quarzkörner haben, handelt es sich in diesem Falle sicher um eine mechanische Absorption des gelösten Farbstoffes durch das capillare Material, um eine „Absorptions-Analyse". Bei derartigen mechanischen Momenten, welche auf dem Wege der Capillarität Farben den Farblösungen überhaupt entziehen, können die angedeuteten Differenzen in der Intensität der Färbung demnach dadurch verstärkt werden, dass gewisse Gewebselemente gewisse, durch Absorption entfernte Farbstoffmoleküle mit der Kraft der Oberflächen-Attraction fester physikalisch binden als andere.

Imbibition, Endosmose, Absorption und die besondere Oberflächen-Attraction zusammen bewirken also nicht einfach eine Aufnahme von Farblösung in das Gewebe, sondern gleichzeitig eine ungleichartige Fixirung der Farbmoleküle aus der Farblösung. Würde man lange genug warten, so müsste aber schliesslich bei rein physikalischer Bindung der Farben das ganze Gewebe diffus in der Farbe der von aussen eindringenden Farblösung gefärbt werden. Nach eingetretener diffuser Färbung durch rein physikalische Bindung der Farben, werden sich bei Einwirkung der Lösungsmittel der Farben dieselben in der umgekehrten Reihenfolge wieder aus dem Gewebe entfernen lassen. Physikalische Färbungen sind nicht waschächt, sondern durch die Lösungsmittel der Farben auswaschbar. Man muss demnach von vornherein erwarten, dass bei rein physikalischer Färbung eine dauernde Färbung nur auf zwei Wegen durch Unterbrechung der Färbung erreicht werden kann:

1. wenn man bei dem Anfärben nach Erreichen gewisser, gewünschter Stadien die Färbung unterbricht, dadurch die diffuse Färbung verhütet und die so direct, aber nur partiell gefärbten Gewebe oder Schnitte in ein indifferentes Medium bringt, oder
2. wenn man nach maximaler Färbung oder Ueberfärbung des ganzen Gewebes, dasselbe wieder durch ein Lösungsmittel entfärbt, aber diese Entfärbung nicht zu Ende führt, sondern in einem gewünschten Stadium unterbricht und nunmehr durch Einlegen in indifferente Flüssigkeiten ein vollständiges Entfärben verhütet, so dass nur bestimmte Elemente entfärbt, andere aber noch gefärbt sind.

Physikalische Verbindungen vollziehen sich nach veränderlichen Verhältnissen und die Intensität der Färbung wechselt mit der Intensität der Farblösungen und der Dauer ihrer Einwirkung, während chemische Verbindungen constant sind und nach der Sättigung der Affinitäten eine ein für alle Mal gegebene äusserste Grenze haben. Im ersten Falle muss man deshalb, um gute Färbungen zu erhalten, stärk verdünnte Lösungen langsam einwirken lassen, wie es bei den directen Karminfärbungen auch ursprünglich geschah und auch bei

den ersten Anilinfärbungen viefach versucht wurde. Im zweiten Falle kann man mit wässrigen Lösungen überfärbte Präparate durch langes Entwässern oder mit Lösungsmitteln, wie Alkohol, Säuren, Glycerin, Anilin, entfärben, oder man setzt, wenn man ein wirkliches Ueberfärben vermeiden will, den wässrigen Lösungen der Farben andere Lösungsmittel der Farben zu. In diesem Sinne ist es jetzt aufzufassen, wenn Hermann und Flemming zu histologischen Studien die Anilinfarben in Wasser und Alkohol lösten, oder wenn neben dem Wasser statt des Alkohols von Schäfer Glycerin, von Ehrlich Eisessig, oder von anderen Alkohol, Glycerin und Essigsäure angewendet wurde. In dieser Hinsicht ist es historisch interessant, dass Koch[1]) schon vor längerer Zeit Methylviolett derart anwandte, dass er von einer concentrirten spirituösen Lösung des Methylviolett oder Fuchsin einige Tropfen zu 15—30 ccm destillirtem Wasser zusetzte, während er das Anilinbraun in einer concentrirten Lösung in gleichen Theilen von Glycerin und Wasser verwendete. Methylenblau überfärbt nach Ehrlich[2]) auch nach langer Einwirkung nicht und der Grund hierzu könnte wohl nach dem Vorausgegangenen darin zu suchen sein, dass es in wässriger Lösung von den meisten Gewebselementen nur locker physikalisch gebunden wird und dass diese lockere Verbindung leicht ausgewaschen wird. Ein gleichartiges feines bindegewebiges Häutchen färbt sich beim Durchtreten einer Methylenblau-Lösung wenig und nur in der Farbintensität der Lösung nnd giebt bei darauffolgendem Durchtreten von Wasser seine ganze Farbe wieder schnell und vollständig ab. Bei demselben Objecte wird das Häutchen durch Vesuvinlösung dunkler als die Lösung gefärbt und behält auch nach gründlichem Auswaschen noch etwas Farbstoff fixirt, welcher also entweder besonders fest physikalisch oder chemisch gebunden sein muss.

Dass diese physikalischen Processe, welche sich zum Theil auf das physikalische Verhalten der Gewebe und zum Theil auf die Lösung der Farben beziehen, bei unseren histologisch-bakteriologischen Arbeiten von grösster Bedeutung sind, zeigt die Praxis täglich.

---

[1]) Cohn's Beiträge zur Biologie der Pflanzen, II. 3. Heft 1877, S. 406.

[2]) Zeitschrift f. klin. Med. 1881, Bd. II, S. 710.

Dass sie durch andere physikalische Processe Veränderungen erleiden, ergiebt die Erfahrung, dass bei gleicher Farbe und Anwendungsweise derselben verschiedenartige vorausgegangene Behandlungen der Schnitte, Grad der Feuchtigkeit oder Trockenheit, Art der Härtung, Abänderungen bewirken.

Diese letzteren Behandlungsweisen der Gewebe mit Alkohol, Chromsäure etc. wirken aber nicht nur physikalisch, sondern sie wirken zum Theil auch chemisch ändernd ein und bilden neue chemische Körper, welche mit den Farbstoffen wohl ächte chemische Verbindungen eingehen. In diesem Sinne ist es auch verständlich, dass Härtungen des Gehirns in Alkohol für Färbungszwecke fast unbrauchbar sind und dass man das Gehirn zum Färben in Chromsäure härten muss.

Die äusseren Einflüsse, wie Licht, Temperatur, wirken nicht nur auf die angeführten physikalischen Vorgänge, sondern sie beeinflussen sicher auch die chemische Affinität.

Die Auswaschbarkeit der Farben durch deren Lösungsmittel ist kein zwingender Beweis für die rein physikalische Bindung der Farben, da auch bei chemischer Bindung die im Gewebe gebildeten gefärbten chemischen Verbindungen in den angewandten Lösungsmitteln leicht löslich sein können.

Während die letzteren Vorgänge allenfalls physikalisch und chemisch gleich befriedigend erklärt werden können, ist bei den eigentlichen Processen der Election eine physikalische Bindung mindestens ganz untergeordnet gegenüber der zweifellosen chemischen Bindung. In dieser Hinsicht ist zu bemerken, dass sich mit derselben Lackmuslösung das Protoplasma roth, die Kerne blau färben. Das Nuclein der Kerne verhält sich nicht nur in den Zellen, sondern auch ausserhalb der Zellen wie eine Säure und bildet mit Farbbasen Salze. Die Färbungen der Zellgranula mit Säurefuchsin, welche Altmann erzielte, sprechen für eine chemische Beziehung dieser Elemente zu bestimmten Farbstoffen.

Dafür, dass bei den Färbungen der verschiedenen Gewebselemente chemische Bindungen den physikalischen übergeordnet sind, spricht auch folgende Beobachtung: Bei Anwendung schwacher wässriger Lösungen färbt sich zwar, entsprechend den Voraussetzungen der physi-

kalischen Bindungen durch Imbibition, Endosmose und Oberflächenattraction, zuerst die Interzellularsubstanz und darauf der Zellleib, während die Kerne zunächst ungefärbt bleiben. Durch Nachbehandlung in diesem Stadium mit Lösungsmitteln der Farbe, wie Alkohol, Glycerin oder Essigsäure, tritt aber jetzt nicht einfach eine Entfärbung der bis jetzt scheinbar allein gefärbten Theile ein, sondern es vollzieht sich eine „Inversion der Färbung", indem die vorher gefärbten Elemente, wie erwartet wurde, farblos werden, während die vorher farblosen Kerne gegen alle Erwartung gefärbt erscheinen.

Die schon erwähnte durchgreifende Thatsache der industriellen Färbungstechnik gilt auch histologisch, wie Ehrlich zuerst erkannte, als er die Anilinfarben nach ihrer Election in basische und sauere eintheilte. Diese Thatsache ist physikalisch vollständig unverständlich und nur durch chemische Verbindungen zu begreifen.

Da wir die Farbbasen und Farbsäuren in der Regel in Form gefärbter Salze anwenden, so werden wir in der Regel im Gewebe die Farbe der Salze wieder finden, auch wenn als Zwischenstadium eine Zerlegung des Salzes und Umsetzung der Farbbase mit Gewebssäure oder der Farbsäure mit Gewebsbase stattgefunden hat. In der Regel entgeht uns ein derartiges Zwischenstadium, weil die im Gewebe sich bildende salzartige, gefärbte Verbindung meist dieselbe Farbe hat, wie das Farbsalz selbst sie von Anfang an besass. Das Entstehen derselben Farbe im Gewebe, wie sie dem angewandten Farbsalze zukommt, beweist demnach gar nichts für eine rein physikalische Bindung, dagegen zeigt die „Inversion" der Färbung bisweilen direct, dass sich noch neben den gewöhnlich allein sichtbaren Endstadien des Fixirtseins der Farbe im Gewebe oder der Entstehung der Farbe im Gewebe wirklich Zwischenstadien bilden, welche mit einer physikalischen Bindung nichts zu thun haben.

Gegen eine einfache mechanische Bindung spricht auch der Umstand, dass die gefärbte Faser nicht die Farbe des festen, sondern des gelösten Farbstoffes annimmt; mit Fuchsin gefärbte Fasern sind roth und nicht metallglänzendgrün; Rhodamin, welches in alkoholischer Lösung fluorescirt, verliert die Fluorescenz nach Verdunsten des Alkohols, also in dünner mechanischer Auflagerung, während mit Rhodamin gefärbte Seide Fluorescenz zeigt. Im Gegensatze zu diesen

Beobachtungen an Pflanzenfasern machte Löffler übrigens an Deckglastrockenpräparaten von Bakterien bei Anwendung von Tanninbeize die Beobachtung, dass nach der Färbung mit alkalischem Fuchsin die gebeizten Stellen „bei schräg auffallendem Lichte den eigenthümlichen grünlich-röthlichen Glanz des festen Fuchsins" zeigten.

Dass die Salze von Farbbasen bei dem Färbeprocess zerlegt werden und sich im Gewebe von Neuem Salze bilden, zeigt sich auch darin, dass sehr stark basische Farbstoffe in Form der Salze Wolle nicht und Kerne und Bakterien nicht oder ganz unächt färben. So sind z. B. die Salze des Methylgrün sehr beständig und ein Wollfaden färbt sich darin nicht, weil er wegen zu schwach saurer Eigenschaften die Salze nicht zerlegt. Macht man jedoch das Bad durch Ammoniak alkalisch, so tritt Zerlegung des Farbsalzes und damit Färbung ein. Die stärker sauere Seidenfaser zerlegt aber auch das Methylgrün in neutraler Lösung und färbt sich.

Etwas ähnliches scheint auch mit den Farbsäuren der Fall zu sein, da beispielsweise wasserlösliche Eosine in schwach saurem Bade auf Wolle und Seide sehr schöne rothe Farben erzeugen.

In anderen Fällen bilden sich aber im Gewebe ganz anders gefärbte Verbindungen in gewissen Formelementen, während andere Gewebselemente sich in der ursprünglichen Farbe der Farblösung färben. Diese Eigenschaft, gewisse Elemente in einer von der Grundfarbe abweichenden Farbe zu tingiren, bezeichnet Ehrlich als „metachromatische" Färbung. Dass hier zweifellose chemische Verbindungen vorliegen, ist unbestritten. So färben z. B. die meisten violetten Anilinfarben (bläuliche Nuancen des Methylviolett, Gentianaviolett, Dahlia) nach Cornil, Henschel und Jürgens die Kerne (und Bakterien) violett, die amyloide Substanz aber roth; Methylgrün färbt die Kerne grün, die amyloide Substanz aber nach Curschmann violett und die hyalinen Harncylinder ultramarinblau. Nach Calberla färben sich mit Methylgrün die Kerne der Zellen des Unterhautbindegewebes und die Kerne der Gefässe und Nervenscheiden rosaroth, die Zellen des Coriums mit den Kernen rothviolett, und die Elemente des Epidermis grünblau bis blau. Das Hämoglobin der rothen Blutkörperchen bildet mit Eosin eine rosaorange Färbung,

während das Stroma und bei kernhaltigen rothen Blutkörperchen auch die Kerne ungefärbt bleiben.

Nach Paneth hält der Inhalt der Theka der Becherzellen des Dünndarm-Epithels die Anilinfarben nicht nur fest, sondern er bildet eine andere Farbe. Dass auch diese Doppelfärbung nur chemisch gedacht werden kann, ist sicher.

Jodgrün färbt nach Griesbach Drüsengewebe grün, manche Epithelien blau, Muskulatur mancher Wirbellosen gelb; Azoblau färbt Bindegewebe violett, Froschleukocyten roth. Methylenblau färbt Bakterien und Kerne blau, Mastzellen violett. Alkalisches Methylenblau färbt die Kerne und Bakterien blau, die Chromatinkörner der Bakterien röthlich.

Sehr entschieden spricht es für chemische Bindungen, dass Agentien, welche einen Farbstoff ausserhalb in bestimmter Weise afficiren oder modificiren, dies nach Fixirung auf der Faser oder im Gewebe nicht mehr oder in anderer Weise thun. Dies ist besonders durch Griesbach[1]) und Unna[2]) in der letzten Zeit nachgewiesen worden. Metaphenylendiamin und salpetrige Säure, welche sich ausserhalb zu braunem Triamidoazobenzol (Vesuvin) verbinden, verleugnen, einzeln auf die Faser gebracht, diese Verwandtschaft. Indophenolviolett, welches die basale Hornschicht weiss, die superbasale blauviolett und die mittlere bläulich färbt, wird ausserhalb durch Wasserstoff zu Indophenolweiss reducirt, aber nach Fixirung im Gewebe nicht mehr. Umgekehrt wird Indophenolweiss ausserhalb zu Indophenolviolett oxydirt, nach der Fixirung im Gewebe, welche es graubläulich färbt, aber nicht mehr.

In der histologischen Technik ist man in erster Linie auf Farben angewiesen, welche in Wasser und den gebräuchlichen Lösungsmitteln löslich sind, gleichgültig ob das färbende Princip sich in Form der freien Farbsäure, Farbbase oder in Salzform findet. Wenn sich nun zufällig entsprechend lösliche Farbbasen oder Farbsäuren als solche finden, welche eine von der Farbe des histologisch gebräuchlichen

---

[1]) l. c. und Anatomischer Anzeiger 1888, III, S. 745.

[2]) Monatshefte f. prakt. Dermatologie 1887, S. 62; Arch. f. mikrosk. Anatomie 1887, Bd. 30, S. 38.

Salzes abweichende Farbe besitzen oder farblos sind, so müsste bei physikalischer Bindung diese Farbe, aber nicht die des Salzes, sich bilden oder es dürfte keine Färbung eintreten. In den bis jetzt bekannten Fällen tritt aber in derartigen Fällen die Farbe des Salzes auf, wodurch das Entstehen einer chemischen Verbindung bewiesen wird. In der farblosen Lösung des reinen Rosanilin als Farbbase färbt sich Wolle nach Jacquemin roth, verhält sich also wie eine Säure. Ebenso färben sich nach Griesbach in der entfärbten Rosanilinsalzlösung die verschiedensten Gewebe roth, während sich alkalisch reagirende Gewebe, wie frischer Muskel, frische Gehirnrinde und frisches Hühnereiweiss nicht färben. Das durch Wasserstoff reducirte, farblose Leuko-Methylenblau färbt nach Unna trotzdem die Kerne blau. Für Farbsäuren gilt dasselbe, so färben nach Griesbach die rothen Sulfosäuren von Amidoazobenzol die Gewebe nicht roth, sondern in der gelben Farbe der Alkalisalze.

Bei gleichzeitiger Anwendung von mehreren Farben färbt nicht etwa diejenige Farbe vorherrschend, welche am schnellsten diffundirt, sondern es findet eine Auswahl statt. Azoblau allein färbt Bindegewebe und Muskulatur blauviolett, Knorpel- und Knochengewebe gar nicht, während Goldorange alle diese Theile gelbroth färbt. Bei gleichzeitiger Anwendung beider Farben färben sich Bindegewebe und Muskulatur violettblau, Knorpel- und Knochengewebe aber gelbroth. Griesbach konnte auf diese Weise selbt vierfache Färbungen erzielen.

Die durch Anwendung von Jod gebildeten Farben sind als chemische Verbindungen aufzufassen, z. B. die nussbraune Farbe der amyloid degenerirten Substanzen bei Anwendung von Jod-Jodkaliumlösungen oder die blaue resp. bläuliche Farbe dieser Substanz bei Nachbehandlung der jodtingirten Schnitte mit Schwefelsäure. Ebenso bilden sich neue Farben bei der combinirten Färbung mit violetten Pararosanilinen und Jod bei der sog. Gram'schen Methode.

Auch die sogenannten Metall-Imprägnationen, welche bei bakteriologischen Studien bis jetzt erst ein geringes Interesse haben, führen zu chemischen Verbindungen und sie verlaufen bei möglichst frischem Zustande der Gewebe am besten. Bei der Bildung der

eigentlichen Farblacke könnten dagegen neben den chemischen auch physikalische Bindungen in Betracht kommen.

Noch mehr muss es für die Existenz ächter chemischer Verbindungen sprechen, wenn die lebenden Gewebe selbst sich färben lassen. Schon Reichel theilte 1758 derartige Beobachtungen an den Gefässen der Pflanzen mit. Ehrenberg färbte 1838 zuerst lebende Infusorien. Göppert und Cohn beobachteten 1843, dass die Cilien der kugeligen „Wimperkörperchen" im Zellinhalte von Nitella flexilis sich bei Zusatz von Karminlösung zum Zellsafte dunkler roth färbten als die umgebende Flüssigkeit. Osborne fand 1856, dass das Gewebe von Weizen, welcher in Karminlösung gewachsen war, sich gefärbt hatte.

Bei Fütterung von Tauben mit Krapp und bei Injection einer neutralen Lösung mit Alizarinnatrium erzielte Lieberkühn 1874 vorübergehende Färbung der verschiedensten Gewebe und der phosphorsaure Kalk der Knochen ging eine dauernde chemische Verbindung mit dem Farbstoffe ein. Nach Wyman werden die Knochen der Schweine in Florida in Folge des Fressens einer Farbwurzel (Lachnantes) rosa gefärbt.

Eine lebende Anodonta zerlegt nach Griesbach in wässriger Jodgrünlösung das Salz; dabei wird die violette Basis frei, bildet aber mit dem Gewebe kein neues Farbsalz, weil keine Säure vorhanden ist.

Brandt versuchte 1881 lebende Amoeben, Flagellaten mit Hämatoxylin und Vesuvin zu färben. Das Vesuvin färbte nur die Fettkörner und eine den Protozoen eigenthümliche celluloseartige Schleimsubstanz, liess aber Kerne und Protoplasma, die es im abgestorbenen Zustande lebhaft färbt, ungefärbt. Fast dasselbe Resultat erhielt gleichzeitig Certes mit Cyanin.

Schulze gelang es 1887 die Zellgranula im Leben mit Methylenblau zu färben. Am wichtigsten sind aber neben den Krappversuchen Lieberkühn's die Versuche von Ehrlich geworden, welcher 1885 in einer später auch anderweitig bestätigten und ergänzten Weise zeigte, dass Methylenblauinjectionen gerade während des Lebens der Thiere geeignet sind, um Nervenendigungen mit einer Sicherheit und Schärfe zu verfolgen, wie es bis dahin mit keinem anderen Mittel

möglich war. Diese Affinität des Methylenblau zum lebenden Axencylinder kann nur eine chemische sein.

Wenn viele Versuche, lebendes Gewebe intra vitam zu färben, scheiterten, so darf man nicht vergessen, dass im lebenden Gewebe durch die amoeboiden Zellen manche Farben als feine Fremdkörper aufgenommen und aus dem Kreislaufe eliminirt werden können, während andere Farben durch Oxydationen oder Reductionen, Säurebildung oder Alkalisirung, überhaupt durch den Stoffwechsel chemisch zerlegt und ausgeschieden werden, ehe es zu einer sichtbaren Bindung kommen kann. Einzelne Farben sind ausserdem für das lebende Protoplasma giftig und dadurch zu solchen Versuchen nur mit Einschränkungen brauchbar. Unter Berücksichtigung derartiger Möglichkeiten dürften aber die bis jetzt gelungenen Färbungen lebender Gewebe nur geeignet sein die Ansicht von einer vorwiegend chemischen Bindung der Farben zu bestätigen. Dass es auch gelungen ist, Bakterien während des Lebens zu färben, sei hier nur kurz erwähnt, weil diese wichtigen Versuche und einige Versuche über Färben lebender Pflanzenzellen später noch in anderem Zusammenhang besprochen werden müssen. Die Zerstörungen von Farben, die Veränderungen von Farben und die Bildungen von Farben durch die Lebensthätigkeit von Mikroorganismen werden gleichfalls später besprochen werden.

Sowohl bei vorwiegend physikalischer Bindung der Farben als bei solchen chemischen Verbindungen, welche leicht löslich sind, kann die Farbe mehr oder weniger leicht ausgewaschen werden. Man bezeichnet derartige Färbungen als unächt im Gegensatze zu den ächten, welche den Lösungsmitteln, in der Technik besonders der Seife gegenüber widerstandsfähig sind, und der uns interessirende höchste Grad des letzteren Verhaltens wird durch die „Säurefestigkeit“ bezeichnet.

Manche Stoffe haben zu den zu färbenden Geweben eine grössere Verwandtschaft als die Farblösungen und werden deshalb leichter von den Geweben sei es physikalisch angezogen oder chemisch gebunden, andererseits verbinden sich diese selben Stoffe aber auch leicht mit den Farben. Hierdurch werden sie zu Vermittlern der Färbung, welche es gestatten, unächte Färbungen in ächte zu verwandeln und

jede Art der Färbung zu sichern. Farben, welche unmittelbar haften, nennt man auch „subjective“ oder „substantive“, und solche, welche nur durch Vermittlung haften, „adjective“ und die vermittelnden Stoffe heissen „Beizen“. Ein Farbstoff kann für ein Gewebe eine subjective Farbe darstellen und dasselbe ächt färben, während er für ein anderes Gewebe als adjective Farbe dient und allein dasselbe unächt färbt; in diesem Falle kann er nur mit Hülfe einer Beize fixirt werden. Die Nothwendigkeit oft die Farben erst durch Beizen zu fixiren, spricht sehr entschieden gegen die mechanische Theorie, da nach dieser grundsätzlich alle Farbstoffe nach den mechanischen Verhältnissen ihrer Capillaren fähig sein müssten, alle Faserstoffe und Gewebe im ungebeizten Zustande direct anzufärben, d. h. ausnahmslos substantive Färbungen zu erzeugen.

Mit Rücksicht auf die verschiedenen vorausgegangenen Darlegungen ist es aber durchaus nicht erforderlich, die ächten Färbungen ohne Weiteres als auf chemischer Bindung und die unächten ohne Weiteres als auf physikalischer Bindung beruhend aufzufassen. Es ist vielmehr sehr wahrscheinlich, dass die ächten und unächten, d. h. vorsichtiger ausgedrückt die widerstandsfähigen und die wenig widerstandsfähigen Färbungen in der Hauptsache gleichartig sind, und in erster Linie sämmtlich auf chemischer Bindung beruhen (Election) und dass die physikalischen Momente lediglich durch Unterstützung die Intensität der Färbung steigern (tinctoriale Kraft). Auf diese Weise umgeht man wohl am einfachsten die von Unna erörterte, mit unseren anderweitigen chemischen Erfahrungen in schroffem Gegensatze stehende Annahme, dass die Färbungen chemische Bindungen sind, welche sich nicht nach den Gesetzen der chemischen Affinitäten gesetzmässig ad maximum sättigen, sondern welche beliebige Grade der Sättigung bis zur Uebersättigung zeigen können, und man trägt den thatsächlichen Beobachtungen des Einflusses der physikalischen Momente gebührend Rechnung.

Indem ich auf diese Weise den verfehlten Erklärungsversuch Unna's ablehnte und den wesentlich chemischen Theil des Vorgangs klar hervorhob, konnte ich vor Allem die dem Histologen sehr wichtigen, dem Farbtechniker weniger geläufigen Beobachtungen

über Inversion und Metachromasie zwanglos mit den einfachen Färbungen unter einem Gesichtspunkte zusammenfassen. Neuerdings hat O. N. Witt eine andere Erklärung versucht, wobei er sich ausschliesslich auf die Färbungen der Technik beschränkte. Er fasst die Färbungsvorgänge als Lösungserscheinungen auf, unter der Annahme, dass nicht nur eine Flüssigkeit, sondern auch ein fester Körper einen anderen festen Körper zu lösen vermag, dass es also auch starre oder feste Lösungen giebt. Hiernach sind die substantiven Färbungen stets feste Lösungen. Witt vergleicht dabei den Färbeprocess mit dem Ausschütteln wässriger Lösungen eines Stoffes durch Aether oder andere in Wasser unlösliche Lösungsmittel. Bei solchem Ausschütteln wird bisweilen gleichfalls die ätherische Lösung eine andere Farbe zeigen als die wässrige und auch die adjectiven Färbungen können allenfalls erklärt werden.

Von den Beizen der industriellen Färbetechnik haben in der Histologie bis jetzt vorwiegend Alaun, zum Theil auch Eisenoxyd, Chromoxydsalze, Quecksilberchlorid und durch Koch, Spina und Löffler auch Tannin Eingang gefunden. Daneben benutzt die Histologie kohlensaures Ammoniak, kohlensaures Lithion und nach Koch auch kaustische Alkalien, nach Weigert Ammoniak, nach Sahli Borax. Durch Ehrlich wurde mit dem Anilin zum ersten Mal auch ein aromatischer Körper eingeführt, an dessen Stelle später auch Ortho-Toluidin durch B. Fränkel, Terpentin durch Prior, Karbolsäure, Resorcin, Pyrogallol durch Ziehl, Pyridin durch de Souza, Thymol durch Brieger und schliesslich durch Ehrlich noch die Aldehyde (Benzaldehyd, Salicyldehyd, Vanillin) verwendet wurden. Ausserdem sind von Unna Versuche gemacht worden mit Naphthol, Seifenwasser, Aq. laurocerasi, Aq. foeniculi, Aq. menthae piperitae, und H. Kühne ermittelte, dass gewiesse Farben für andere Farben die Rolle von Beizen übernehmen können, was auch Knecht für die Färbungen von Pflanzenfasern feststellte.

Die älteste Beize der Histologie dürfte wohl das kohlensaure Ammoniak sein, da es sich bei der Herstellung des Ammoniak-Karmins herausgestellt hatte, dass die frische, freies Ammoniak enthaltende Lösung schlechter färbte, während ältere, kohlensaures Ammoniak enthaltende Lösungen besser färbten. Doch wurde die Eigenschaft

des Ammoniumcarbonats, als Beize zu functioniren, erst später durch Gierke und Maschke erkannt. Die erste durch Böhmer 1865 richtig erkannte Beize dürfte wohl im Alaunzusatze der Hämatoxilinlösungen gegeben sein. Eine vollständig neue Wendung nahm die Frage, als es Koch 1882 gelungen war, Tuberkelbacillen durch alkalische (Kali caust.) Methylenblaulösung zum ersten Mal zu färben und als bald darauf Ehrlich das Anilin zur Unterstützung der Tuberkelbacillenfärbung einführte und mit seiner Hülfe den Tuberkelbacillus in allen Farbbasen färben konnte. Zuerst hatte Ehrlich die Wirkung des Anilin nach Analogie der Koch'schen Färbung in dessen schwach basischen Eigenschaften gesucht, und erst durch den Nachweis von Ziehl, dass man die Tuberkelbacillen auch in einem mit Essigsäure bis zur sauren Reaction versetzten Anilinwasser-Methylviolett färben und dass man das schwach basische Anilin vortheilhaft durch Karbolsäure ersetzen kann, wurde es klar, dass allen diesen Zusätzen etwas gemeinsames zu Grunde liegen muss, was sich mit der Alkalescenz nicht deckt, dass sie als Beizen, als Bindemittel zwischen Gewebe und Farbe wirken. Das neue bei Verwendung der Anilinbeize war, dass die mit ihrer Hülfe gefärbten Tuberkelbacillen nicht nur waschächt gefärbt waren, sondern dass sie auch starken Mineralsäuren widerstanden, dass sie säurefest waren. Gegenüber der Eigenschaft als Beize zu wirken, erscheint die von Gottstein in den Vordergrund gestellte Eigenschaft dieser Zusätze, concentrirtere Farblösungen zu ermöglichen, als untergeordnet, da hiervon oft gar kein Gebrauch gemacht wird.

Die Basen, Phenole und Aldehyde sind aber chemisch so different, dass man von vornherein kaum erwarten kann, dass sie als Beizen alle im gleichen Sinne wirken. Zu dieser Schwierigkeit kommt die weitere, dass selbst bei den einfachsten und längst bekannten Beizen, wie Alaun und Tannin, unter den Farbchemikern keine volle Uebereinstimmung herrscht. Die einen Autoren treten auch hier für eine wesentlich physikalische, andere für eine chemische Auffassung ein. In der Druckerei taucht man die Gewebe zuerst in die Beize und fixirt nach der einen Auffassung durch Oberflächenattraction Alaun resp. Tannin, dann bringt man die gebeizten Gewebe in die Farbe und benutzt die Eigenschaft des Alaun oder der Gerbsäure,

um secundär die Farbe zu fixiren. In der Histologie lässt man die Farbverbindungen der Beize mit dem Farbsalz gewöhnlich gleichzeitig, nach Analogie der Zeug-Färberei, einwirken. Die Wirkung der Beizen auf die Gewebe könnte aber auch eine chemische sein und es könnten sich zuerst Verbindungen der Beize mit dem Gewebe und dann eine chemische Bindung der Farbe durch diese neue chemische Verbindung des Gewebes einstellen, wie es z. B. für die Chromsäurehärtung des Gehirns fast als sicher anzusehen ist. Es liegt auf jeden Fall kein Grund vor, bei dem jetzigen Stande des Wissens die Wirkung aller Beizen auf dieselbe Weise zu erklären.

Der Zusatz der Säuren zu Farbbasen resp. deren Salzen hat einerseits den Zweck einige Gewebselemente, besonders das Zellplasma und Collagen etwas aufquellen zu lassen und durchsichtig zu machen, was besonders von der Essigsäure gilt, und das Nuclein stärker schrumpfen zu machen. In Folge dessen treten die Kerne deutlich hervor und nehmen die Farbe gut an, während umgekehrt die gequollenen Gewebselemente die Farben nicht so gut festhalten wie die Kerne. Dann haben die Säuren auf manche Farbbasen einen vernichtenden oder doch die Färbung beschränkenden Einfluss und sie verhüten deshalb ein Ueberfärben.

Der Zusatz der Alkalien dürfte wohl eine ganz verschiedene Bedeutung haben. Bei Weigert's Lösung (Liquor ammon. caust. 0,5, Alkohol absol. 10,0, Gentianoviolett 2,0, Aq. dest. 100) ist der Zusatz so gewählt, dass sich der Farbstoff nicht mehr im Zustande vollkommener Lösung, sondern in einem Stadium der Vorbereitung zur Ausfällung befindet — Unna's Schwebefällung —, in dem er besonders zu einer physikalischen Bindung geeignet sein dürfte.

Bei den Methoden von Koch (1 ccm concentrirte alkoholische Lösung von Methylenblau, 200 ccm dest. Wasser und 0,2 ccm einer 10%-Kalilauge) und Löffler (30 ccm concentrirte alkoholische Lösung von Methylenblau und 100 ccm einer Kalilauge von 1 : 10000) könnte die Sache vielleicht so liegen, dass Methylenblau in neutraler Lösung durch das gegenüber dieser starken Base viel zu schwach sauere Gewebe nicht zerlegt wird, dass aber seine sauren Eigenschaften zum Zerlegen der Farbe und also zum Bilden gefärbter neuer Salze im Gewebe ausreichen, wenn man vorher Alkalien

als noch stärkere Basen auf die Farbbase einwirken lässt. In diesem Falle ist wenigstens eine Schwebefällung nicht vorhanden. Bei der Anwendung von 0,5—1 % kohlensaurem Ammoniak nach H. Kühne bildet dieses mit dem Farbsalz vor der Färbung ein Doppelsalz. Bei längerem Stehen könnte übrigens dieses Moment bei den Lösungen von Koch und Löffler eventuell mit in Frage kommen, da das Kaliumhydrat durch die Kohlensäure der Luft zum Theil in kohlensaures Kali übergehen muss.

Die Wirkung der Alkalien scheint nicht oder doch nicht in allen Fällen diejenigen der ächten Beizen zu sein, wenigstens kann man die Wirkung auch anders erklären.

Während wir jetzt, ohne Rücksicht auf die vorausgegangene Behandlung der Präparate, die Beizen gleichzeitig mit den Farben in der bewussten Absicht verwenden, dadurch die unächten Färbungen in ächte zu verwandeln oder gar Säurefestigkeit zu erzielen, hatte man früher empirisch dieses Ziel einer guten, dauernden Färbung vielfach durch die der Färbung vorausgehende Behandlung erreicht. Bei Schnittpräparaten wirken besonders die Härtungen in Chromsäure, Quecksilberchlorid, zum Theil auch diejenigen in Alkohol durch Bildung neuer chemischer Verbindungen und eventuell auch durch günstige Veränderung der physikalischen Beschaffenheit als Beizen. Die Vorbehandlung der Schnitte oder Trockenpräparate mit Säuren (Essigsäure nach Friedländer, Oxalsäure nach H. Kühne) kann die Farbauslese begünstigen; besonders wichtig ist die vorherige Entfernung des Hämoglobin durch Essigsäure nach Günther geworden.

Die vorherige Behandlung von Schnitten und Trockenpräparaten mit Alkalien begünstigt durch partielle Quellung oder in der oben bei Methylenblau angegebenen Weise direct durch Zerlegung der Farbbasen die Färbung. Biedert konnte eine gute Tuberkelbacillen-Färbung erzielen, wenn er vorher das bacillenhaltige Sputum mit verdünnter Natronlauge kochte.

Unna isolirte die Bacillen im Lupusgewebe durch Verdauung des Gewebes mit Pepsin-Salzsäure.

Die Fixirung und Homogenisirung des Eiweiss in Trockenpräparaten durch Chromsäure oder Alkohol nach Koch, durch mässiges

Erhitzen nach Ehrlich begünstigt die Färbung mancher Elemente. H. Buchner und mir gelang es dann durch systematisches Erhitzen von Trockenpräparaten die sonst schwer färbbaren Sporen leichter färbbar und säurefest zu machen und zugleich den Bakterien selbst und den Kernen die Färbbarkeit mehr und mehr zu nehmen, so dass wir isolirte Färbung der Sporen erhielten.

Durch Tanninbeize der Trockenpräparate konnte Spina gewöhnliche Bakterien so säurefest machen, dass sie sich bei der Färbung ähnlich den Tuberkelbacillen verhielten.

Das den Tuberkelbacillen analoge Verhalten der Smegma- und Ohrschmalzbacillen hatte die Aufmerksamkeit auf das Einfetten als Mittel zur Erzielung von Säurefestigkeit gelenkt und Bienstock gelang es auch durch Kultur auf Butter-Agar Bakterien bis zu einem gewissen Grade säurefest zu machen. Es stellte sich dabei heraus, dass entgegen der Auffassung von Bienstock das bei den Präparaten auf die Deckgläser gestrichene und von den trockenen Bacillen eingesogene Fett die Ursache der Säurefestigkeit war. Säurefest sind auch die Fettsäurekrystalle, welche deshalb auch als „Pseudobacillen“ (Celli- und Guarnieri) bezeichnet wurden, Lanolin, Mastzellenkörner.

Praktische Bedeutung haben von den vorher genannten vielen histologischen Beizen, welche direct als solche verwendet werden — von den vorausgehenden und zum Theil gleichfalls im Sinne von Beizen wirkenden Härtungen sehe ich hier ab — von den Basen: die von Löffler eingeführte Concentration von Kaliumhydrat und Ammoniumcarbonat nach H. Kühne; von den aromatischen Körpern: das Anilinwasser nach Ehrlich, und als universellste von allen Beizen hat sich uns die 5%-Karbolsäure nach Ziehl erwiesen. Ob die Verwendung von Farben als Beize nach H. Kühne praktische Bedeutung gewinnt, lässt sich bis jetzt noch nicht übersehen.

Bei einer allgemeinen Betrachtung über die Färbung muss ich wenigstens noch kurz die weitere Behandlung der Präparate erwähnen. Nach Erreichung der gewünschten Färbung müssten die Präparate eigentlich sofort in Flüssigkeit eingeschlossen werden, welche gar keinen Einfluss auf die Färbung ausüben nnd welche gleichzeitig

optisch genügen. Dies ist bis zu einem gewissen Grade bei den Trockenpräparaten direct zu erreichen. Bei den übrigen Behandlungsmethoden der Schnitte bedarf es einer vorhergehenden Entwässerung der Schnitte mit Alkohol oder Anilinöl (Weigert), welche beiden Mittel aber Farben lösen, so dass oft eine anderweitige Correctur nöthig ist, indem man nach H. Kühne den Alkohol oder das Anilinöl mit einem Zusatze der ursprünglichen Farbe versieht.

Vor Ueberführung der Präparate in das häufigste Einschlussmittel, Balsam, muss man je nach der Methode verschiedenartige aufhellende ätherische Oele anwenden, welche zum Theil gleichfalls Farbe lösen, so dass auch hier Correcturen anzubringen sind, welche von Fall zu Fall wechseln.

Fast alle Färbungsmethoden, welche wir besitzen, sind ohne Rücksicht auf die vorausgegangenen theoretischen Gesichtspunkte rein empirisch gefunden worden. Manche derselben wurden aber auch wieder verlassen, weil die rohe Empirie zum vollen Durcharbeiten nicht ausreichte, und sie wurden später von Neuem hervorgeholt oder auch erst wieder neu entdeckt, als die theoretische Einsicht in die zu Grunde liegenden Vorgänge weiter geschritten war. Die theoretischen Untersuchungen von Ehrlich, H. Virchow, Griesbach, Gierke, Unna u. A. haben über die empirischen Färbungsmethoden der Bakterien von Weigert, Koch, H. Kühne ein neues Licht verbreitet. Ich selbst hatte in der dritten Auflage dieses Werkes versucht, eine gewisse Ordnung in das zerstreute Material zu bringen und Unna hat dasselbe noch weiter gesichtet. Vor Anführung der uns jetzt zu Gebote stehenden Methoden möchte ich noch einige praktische und theoretische Bemerkungen vorausschicken.

Bei Abwesenheit allen Wassers aus einem Gewebe muss die kräftigste Diffusion und damit die schnellste Färbung durch concentrirte, wässrige Lösungen der Farben zu erwarten sein. Bei Verwendung alkalischer Lösungen der Farben muss eine vorausgegangene Behandlung der Schnitte mit Säuren die Diffusion begünstigen.

Demgegenüber muss eine verdünnte wässrige Lösung der Farben die Färbung verlangsamen und im zweiten Fall muss das Weglassen der Vorbehandlung mit Säure ebenso wirken. Ebenso muss der Zusatz von farblösenden Mitteln zu wässriger Lösung der Farben, wie Glycerin, Essigsäure, Salzsäure, Alkohol, verlangsamend auf die Färbung wirken und die Intensität der Färbung herabsetzen. Gerade bei sehr intensiv färbenden oder leicht überfärbenden Farben, wie es z. B. die violetten basischen Anilinfarben fast alle sind, muss deshalb eine Herabsetzung der tinctorialen Kraft und eine Verlangsamung der Färbung die Schönheit des Farbbildes erhöhen. Diese einfachen Beziehungen erfahren noch Complicationen wenn man Beizen zu Hülfe nimmt.

Alle diese Dinge müssen für jede Methode und Farbe, für jedes Gewebe und jeden Mikroparasiten besonders geprüft werden und es ist deshalb bei den allgemeinen Methoden keine besondere Rücksicht darauf genommen, ob die Färbung ohne oder mit Hülfe von Beizen erzielt wurde.

Erfahrungsgemäss sind manche einfache Färbungen die dauerhaftesten. Bei einzelnen mehrfachen Färbungen treten noch im Verlaufe der Zeit secundäre Umsetzungen ein, durch welche nachträgliche Entfärbungen zu Stande kommen. Umgekehrt sind aber gerade mehrfache Färbungen oft am besten geeignet oder geradezu nothwendig um wichtige Einzelheiten hervortreten zu lassen. Die besten Methoden für wissenschaftliche Untersuchungen liefern deshalb nicht ohne Weiteres auch die besten Dauerpräparate für Sammlungen, und schöne Präparate für den Mikroskopir-Sport sind noch lange nicht immer gute Präparate.

---

5. Allgemeines über die Färbungs-Methoden.

Das Ziel jeder Methode ist durch Ausnutzung der Election die differenten normalen und abnormen Gewebsbestandtheile und die im Gewebe vorhandenen Mikroorganismen scharf von einander zu tren-

nen. Im Gewebe selbst handelt es sich wesentlich um eine Differenzirung von Kernen und Protoplasma und erst in zweiter Linie um eine weitere Färbung bestimmter Gowebselemente neben der allgemeinen Kern- und Protoplasmadifferenzirung. Viele Mikroparasiten verhalten sich den Färbungen gegenüber als kernhaltige protoplasmatische Gebilde wie die Zellen selbst und bei diesen handelt es sich bis jetzt in erster Linie um eine möglichst schonende Conservirung der Formen und scharfe Darstellung dieser besonderen Formen neben den morphologischen Gewebsbestandtheilen. In derartigen Fällen sind besonders Methoden angebracht, welche die Kerne recht scharf hervortreten lassen, so dass sofort alles charakterisirt ist, was nicht zu den Kernen gehört. Neben den Kernen müssen aber in der Regel auch die Begrenzungen des Protoplasma scharf zu erkennen sein und es wird sich demnach in der Regel um Combinationen von guten Kernfärbungen mit guten Protoplasmafärbungen handeln. Die besten derartigen Methoden färben bis jetzt beides, Kerne und Protoplasma, so dunkel, dass fremde Elemente, also auch Mikroparasiten, daneben oft nicht zu sehen sind, weil sie einfach verdeckt werden. Man wird deshalb in Zukunft auch mehr versuchen müssen, helle, aber scharf differenzirende Kern- und Protoplasmafärbungen zu suchen, in und neben denen fremde Elemente schärfer erkannt werden.

Bei den Bakterienfärbungen werden im Allgemeinen die Bakterien in toto wie die Kerne gefärbt und sie sind dadurch leicht vom Protoplasma zu trennen. Die Dunkelfärbungen sind aber dabei oft sehr störend. So sollen z. B. nach Baumgarten die Tuberkelbacillen im Gewebe, welches in der histologisch fast unübertroffenen Flemming'schen Lösung gehärtet ist, gar nicht zu sehen sein, während Stschastny bei mir fand, dass sie bei dieser Härtung ganz gut gefärbt werden können, aber leider nur zum Theil durch die dunkle Kern- und Protoplasmafarbe verdeckt werden.

Bei den Bakterien gelingt aber vielfach eine noch viel bessere Differenzirung, indem man die Bakterien in einer ganz anderen Farbe als Kerne und Protoplasma färben kann und schliesslich gelang es Koch auch als Erstem eine bestimmte Bakterienart so zu färben,

dass sie sich von den anders gefärbten übrigen Bakterien, von den Kernen und dem Protoplasma in einer anderen Farbe abhob.

Unsere Aufgabe ist demnach

I. die Bakterien und ev. auch andere Mikroparasiten möglichst isolirt zu färben und

II. durch differente Färbung der verschiedenartigen Formelemente dieselben scharf gegeneinander abzuheben.

I. Die directen monochromatischen Färbungen.

Dieselben haben zu bakteriologischen Zwecken bis jetzt noch keine rechte Anwendung gefunden. Nach dem Vorausgegangenen müssen dieselben 1. mit ganz verdünnten, eben noch wahrnehmbar gefärbten wässrigen Lösungen vorgenommen werden. Man muss von Zeit zu Zeit einen Schnitt herausnehmen und so das Eintreten der richtigen Färbung ausprüfen.

Für derartige Färbungen dürften sich wohl die Siebdosen ganz besonders eignen oder man wendet die Unna'sche Trichtermethode[1]) an. Auf eine leere Flasche wird ein mittelgrosser Glastrichter lose aufgesetzt. „In den sich nach unten verengenden Hals des Trichters giebt man ein loses Watteflämmchen, welches man mit einer stumpfen Nadel so weit in denselben hineinschiebt, dass in den Trichter eingegossenes Wasser nur sehr langsam hindurchtropft." Hierauf giesst man die Farblösung in den Trichter, thut die Schnitte hinein, welche sich auf dem Wattepfröpfchen im Trichterhalse sammeln. In Folge dessen kommt jeder Tropfen der schwachen Farblösung mit den Schnitten in Berührung und die Färbung steht niemals stille.

Da wässrige Lösungen für Bakterien in Schnitten wohl nur selten in dieser Weise genügen dürften, weil andere Gewebselemente sich vermuthlich in der Regel leichter färben werden, kann man entweder dem Wasser a) Mittel zusetzen, welche die Färbung der Bakterien erleichtern, also z. B. statt Wasser verdünnte Kalilauge 1:10000, oder 0,5 % Lösung von kohlensaurem Ammoniak oder Anilinwasser

---

[1]) Monatshefte f. p. Dermatologie, 1886, V. S. 126.

nehmen, oder b) man wählt Zusätze, welche die Färbung der Gewebe erschweren, wie Essigsäure oder Oxalsäure unter den Säuren, oder Glycerin oder Alkohol. Diese letztere Methode ist bis jetzt in der directen Weise in verdünnten Lösungen nach Unna nicht zur Anwendung gekommen und sie erscheint deshalb bis jetzt mehr als ein mögliches Uebergangsglied zu der von Ehrlich ausgebildeten 2. Methode der directen specifischen Färbung durch Beschränkung der Färbkraft vermittelst farblösender Zusätze zur wässrigen Farblösung. Als Beispiel kann die Färbung der Mastzellen nach Ehrlich-Westphal[1]) dienen. Während schwächere essigsauere Lösungen noch gute Kernfärbungen geben, sollen bei 6 bis 8 %igen essigsaueren Lösungen nur noch die Mastzellenkörner ihre Verwandtschaft zu der gewählten basischen Anilinfarbe geltend machen. Nach Friedländer[2]) sollen aus ähnlichen Gründen die folgenden Lösungen besonders geeignet sein, die sog. Kapselkokken bei Pneumonie in Schnitten darzustellen.

a) Fuchsin 1
Eisessig 2
Alkohol 5
Aq. dest. . . . . 100.

b) Conc. alkohol. Lösung von Gentianaviolett 50
Aq. dest. 100
Eisessig . . . . 10.

Für dieselben Bakterien in Deckglaspräparaten empfiehlt Ribbert[3]) nach dem Vorgange von Ehrlich eine Mischung aus 100 Wasser, 50 Alkohol, 12,5 Eisessig, welche in der Wärme mit Dahlia gesättigt werden.

Für Tuberkelbacillen wurde von Rindfleisch[4]) vorgeschlagen, die Färbung unter gleichzeitigem Erwärmen in einer Mischung von Wasser, Alkohol und Salpetersäure zu gleichen Theilen mit Zusatz

---

1) Westphal: Ueber Mastzellen. Dissert. Berlin 1880.
2) Fortschritte der Medicin 1885, S. 92.
3) Deutsche med. Wochenschrift 1885, S. 136.
4) Sitzungsberichte d. Würzburger med.-physik. Gesellschaft 1882, No. 8.

von Fuchsin vorzunehmen, und für dieselben Bakterien hatte Ziehl[1]) Erfolge zu verzeichnen, als er die Anilinwasser-Methylviolettlösung mit Essigsäure bis zur sauren Reaction versetzte. H. Kühne[2]) färbte viele Bakterien durch eine concentrirte wässrige Lösung von Methylviolett, bei der auf 50 ccm Farblösung 1 Tropfen Salzsäure zugesetzt war.

II. Die indirecten monochromatischen Färbungen.

Bei denselben wird zuerst eine diffuse Färbung oder eine Ueberfärbung einzelner Elemente bewirkt und dann wird durch Lösungs- oder Lockerungsmittel der Farben eine partielle Färbung bestimmter Elemente herbeigeführt. Die Ueberfärbung erfolgt in der Regel unter Zuhülfenahme von Beizen, doch werden hierbei oft die Färbekraft etwas beschränkende Zusätze, besonders von Alkohol, gemacht. Die maximale Entfärbung geschieht durch die verschiedenartigsten Mittel, welche zum Theil physikalisch, zum Theil chemisch wirken; zu den ersteren rechnet Unna Alkohol, Anilin und die Oxydationsmittel. Es ist jedoch momentan noch etwas schwierig, alle Phasen dieser Entfärbungen genau zu analysiren, so dass ich die Mittel jetzt noch nicht so scharf trennen will.

1. Entfärbung durch reinen absoluten Alkohol wurde von Weigert[3]) eingeführt, um in Schnitten, welche in wässrigen Lösungen basischer Anilinfarben überfärbt waren, die Kerne und Bakterien zu differenziren. Die Schnitte blieben so lange in Alkohol, bis kein Farbstoff mehr abgegeben wurde und selbst bei mehr als einstündigem Verweilen im Alkohol blieben Kerne und Bakterien gefärbt. Hierdurch sind die Schnitte auch sofort entwässert. Nach Günther[4]) entfärbt allerdings absoluter Alkohol absolut trocken gemachte gefärbte Präparate nicht; nach Witt dagegen entzieht absoluter Alkohol, der keine Affinität zum Fuchsin hat, der mit Fuchsin gefärbten Seide, welche so farbächt ist, dass sie unter

[1]) Deutsche med. Wochenschrift 1882. S. 451.

[2]) Ueber ein kombinirtes Universalverfahren. Dermatologische Studien. VI. Heft, 1887, S. 13.

[3]) Virchow's Archiv 1881, Bd. 84, S. 275.

[4]) Einführung in das Studium der Bakteriologie 1890. S. 72.

Einwirkung von Seifenlösung ihren Farbstoff nicht verliert, fast augenblicklich ihren Farbstoff, während bei Verdünnen des Alkohols durch Wasserzusatz zu der alkoholischen Fuchsinlösung eine Rückkehr des Farbstoffes zur Seide erfolgt.

2. Die mehr und mehr wichtig werdende Differenzirung durch Anilin wurde von Weigert[1]) eingeführt und von H. Kühne verallgemeinert. Anilin ist nicht nur durch seine lösenden Eigenschaften ein Differenzirungsmittel, sondern es entwässert auch die Schnitte, so dass es alle Eigenschaften hat, welche man früher, vom directen Trocknen abgesehen, allein bei dem Alkohol kannte. Es eignet sich in Folge dessen, um in schonender Weise Differenzirungen der Farben und gleichzeitig Entwässerung zu bewirken, welche man sonst in weniger schonender Weise durch Alkohol bewirken müsste. Da der Differenzirung der Bakterien (und Kerne) durch die maximale Entfärbung mit Alkohol oder Anilin oder durch irgend ein anderes Mittel eine Entwässerung durch Alkohol oder Anilin folgen muss, diese Entwässerung aber zur Zeit nur durch Trocknen und diese beiden Mittel geschehen kann, welche Farben lösen, so würde leicht eine zu starke Entfärbung bewirkt werden können. Um dies zu vermeiden, fügte H. Kühne sowohl dem zum Entwässern dienenden Alkohol als dem Anilin etwas von der Farbe hinzu, in der die erste Färbung erfolgte. In Folge dieses Farbzusatzes tritt keine weitere Entfärbung ein, sondern Alkohol und Anilin wirken nur noch wasserentziehend.

3. Entfärbung durch organische und anorganische Säuren. Die Entfärbung in verdünnter Essigsäure ist gleichfalls von Weigert eingeführt; dieselbe wurde oft mit der Entfärbung durch Alkohol verbunden. Zur isolirten Färbung der Tuberkelbacillen wurde von Ehrlich[2]) die Behandlung der Schnitte mit starken Mineralsäuren von ca. 20—25 % Säuregehalt eingeführt. Ehrlich selbst bediente sich der Salpetersäure, Orth der Salzsäure und Ziehl-Neelsen der Schwefelsäure. Die Entfärbung wurde bisweilen in einem Acte vorgenommen, während Koch die Entfärbung

[1]) Fortschritte der Medicin, 1887. V. No. 8.
[2]) Deutsche med. Wochenschrift 1882, S. 269.

in zwei Theile schied, indem er den Hauptantheil des Farbstoffes durch Salpetersäure entfernte, den Rest aber in etwas schonender Weise, um ein Entfärben der Tuberkelbacillen selbst möglichst zu verhüten, durch 60 % Alkohol entfernte. H. Kühne hat dann in der letzten Zeit ein für die meisten Bakterien geeignetes Universalverfahren angegeben, bei dem die überfärbten Schnitte durch schwach salzsäurehaltiges (1 p. m.) Wasser differenzirt werden.

4. Entfärbung durch sauere Anilinfarben. Bei Gelegenheit der Versuche mit den saueren Anilinfarben Protoplasmafärbungen zu erzielen und dadurch gegenüber den Kern- und Bakterienfarben Contrastfarben zu gewinnen, wurde von verschiedenen Seiten unabhängig die Beobachtung gemacht, dass die verwendeten saueren Anilinfarben auch Entfärbungsmittel überfärbter Gewebe sind und sich dadurch zur maximalen Entfärbung eignen. Die Form der Anwendung war eine sehr verschiedene.

Löffler führte Tropaeolin in Verbindung mit Essigsäure ein Jackson und ich bedienten uns bei Untersuchungen über Wildseuche und Abdominaltyphus vortheilhaft des Eosins in stark verdünnter alkoholischer Lösung ohne Säurezusatz; Johne löste Eosin und Pikrinsäure in Nelkenöl; Kükenthal löste Anilinfarben und Karmin in Terpentinöl und Nelkenöl, Eisler in Bergamottöl; H. Kühne[1]) führte die Lösung von Fluoresceïn in Nelkenöl ein und erkannte in der letzten Zeit als den geeignetsten ölartigen Körper zum Auflösen von Anilinfarben und zum Differenziren das Anilin.

5. Entfärbung durch basische Anilinfarben wurde durch H. Kühne einige Mal mit Erfolg versucht, z. B. mit Auramin und Safranin. Ob es sich hier aber um ächte maximale Entfärbung handelt oder nicht vielmehr um eine auf Election beruhende unvollkommene Doppelfärbung, oder ob nicht ganz einfach das Lösungsmittel, wie Alkohol, Oel, schon allein die Entfärbung bewirkte, ist noch nicht ganz klar.

6. Entfärbung durch Salze wurde durch Koch[2]) eingeführt. Es gelang ihm in überfärbten Schnitten durch Behandlung

---

[1]) Zeitschrift f. Hygiene 1886, S. 553. Dermatolog. Studien. VI. Heft. 1887.
[2]) Wundinfectionskrankheiten 1878, S. 39.

mit kohlensaurem Kali die Bakterien isolirt darzustellen. Eine wesentliche Verbesserung erfuhr diese Methode durch Gram[1]). Gram führte Jod-Jodkalium ein und ermittelte, dass wenn man mit Anilinwasser-Gentianaviolett gefärbte Schnitte erst mit Jod-Jodkalium und darauf mit Alkohol behandelte, nur noch bestimmte Bakterien in auffallend blauschwarzer Farbe gefärbt blieben. Jodtinctur allein und Jodkalium hatten nicht dieselbe isolirende Wirkung, da sich hierbei meist auch die Bakterien entfärbten. Doch ermittelte Gram weiter, dass man durch 1 % Sublimatlösung Pneumokokken und Typhusbacillen isolirt färben kann. Gottstein[2]) erkannte dann, dass die Fähigkeit der maximalen Entfärbung und damit die Möglichkeit der isolirten Färbung bestimmter Elemente den Salzen gemeinsam ist. Metallsalze, Salze der Alkalien und Erden und viele andere (Kali bichrom., Goldchlorid, Argent. nitr., Chlornatrium, Alaun, kohlensaure, schwefelsaure Alkalien, Jodkalium) lockerten in gefärbten Präparaten den Farbstoff so, dass man ihn durch Alkohol auswaschen konnte. Aehnliches ermittelte Lustgarten für Kali hypermangan., Fütterer für Palladiumchlorid, de Giacomi für Eisenchlorid. Zuerst entfärben sich dabei Protoplasma und Intercellularsubstanz, später die Kerne und auch die meisten Bakterien, während die Lepra- und Tuberkelbacillen und einige Pyämiebakterien am längsten Widerstand leisten. Steigerung der Concentration der Salze befördert die Entfärbung und auf der anderen Seite ist die Natur der Farbsalze für die Festigkeit der Bindung wichtig, insofern z. B. die Pararosaniline schwerer zu entfärben sind als die Rosaniline.

Gottstein fasste das Entfärben durch Salze physikalisch als ein Entsalzen nach Art der Seifenfällung durch Kochsalz auf. Die Anilinfarben sind in den Salzlösungen unlöslich, der Zusatz derselben zu den gefärbten Präparaten bewirke demnach, dass die Farben aus den Geweben ausgefällt werden, sodass diese niedergeschlagenen Farbpartikel (in Deckglaspräparaten) mit Wasser abgespült oder (in

---

1) Fortschritte der Medicin 1884, II, No. 6.

2) Fortschritte der Medicin 1885, III, No. 19.

Schnittpräparaten) durch Alkohol, in dem sich der Niederschlag löst, ausgezogen werden können.

Nachdem B. Fränkel und ich schon früher bei der Differenzirung der Tuberkelbacillen durch Mineralsäuren auf die vorübergehende Bildung von Doppelsalzen und Tripelverbindungen hingewiesen hatten, machte Unna es wahrscheinlich, dass auch die Entfärbung durch Salze in ähnlicher Weise, also chemisch und nicht physikalisch, zu Stande kommen dürfte. Die zur Entfärbung benutzten Salze verbinden sich in dem gefärbten Gewebe zu Doppelsalzen. Bei diesen chemischen Umsetzungen bilden sich dort, wo der Farbstoff fester gebunden war, gut haftende Tripelverbindungen von Gewebe plus Farbsalz plus Entfärbungssalz, während in den anderen Theilen eine Lockerung des Farbstoffs eintritt, welche dessen Ausspülung erleichtert.

7. Entfärbung durch Jod, Brom und Chlor. Während Gottstein die Gram'sche Isolirung durch Jod-Jodkalium auf die Salzwirkung des Jodkalium zurückführen wollte, hatte Gram selbst und später auch Weigert hervorgehoben, dass die dunkelblaue, fast blauschwarze Färbung der Bakterien auf eine neue Verbindung des Jod mit dem Farbstoff hinweise. Lutz und Unna zeigten dann, dass die schon von Gram beobachteten Körnelungen der Bakterien als eine Jodwirkung und nicht als eine Jodkaliumwirkung aufgefasst werden müsse, und sie fanden weiter, dass freies Jod nur in Verbindung mit Pararosanilinen derart wirkt, aber nicht mit Rosanilinen. Nur Baumgarten erhielt auch mit Fuchsin, in der Gram'schen Form verwendet, positive, aber viel schlechtere Resultate als mit Gentianaviolett. Da das Fuchsin eigentlich eine Mischung von essigsaurem und salzsaurem Rosanilin sein sollte, würde dies in Widerspruch mit der Ansicht von Unna stehen. Das käufliche Fuchsin ist aber in der Regel nicht nur eine Mischung der genannten Rosaniline, sondern es enthält vielfach auch die analogen Pararosaniline beigemischt, sodass es möglich ist, dass Baumgarten's positive Resultate derartigen Verunreinigungen zu verdanken sind, während fast alle anderen Beobachter nur mit den violetten Pararosanilinen positive Resultate erhielten.

Bei der Jod-Jodkaliumlösung nach Gram erfolgt keine einfache Entfärbung durch das Jodkalium, sondern in erster Linie eine Jodverbindung des Farbstoffs. In der Lösung geht beständig eine spurenweise Zersetzung in Jod und Jodkalium vor sich. Dieselbe wird energischer, wenn man statt reinem Alkohol, wie schon Gram beobachtet hatte, einen 3 % Salzsäure oder Salpetersäure haltigen Alkohol verwendet, was auch Günther[1]) als praktische Verbesserung empfiehlt. Bei der Salpetersäure spielt eine Zerlegung durch Oxydation mit und dies brachte Lutz[2]) dazu, rauchende Salpetersäure bis zu 10 und selbst 50 % anzuwenden. Neben der ev. Oxydation muss auch das Jodkalium als Salz die Entfärbung begünstigen.

Statt dieses langsamen Freimachens des Jod nach Gram schlug Unna[3]) vor, das Jod in statu nascendi auf die gefärbten Präparate einwirken zu lassen. Unter den verschiedenen Formen zur Erzielung von freiem Jod giebt Unna selbst einer concentrirten Lösung von Jodkalium mit Wasserstoffsuperoxyd den Vorzug. Die anfangs klare Mischung bräunt sich durch ausgeschiedenes Jod, während sie gleichzeitig durch Sauerstoffbläschen in eine schaumige Masse verwandelt wird. Neben dem freien Jod entsteht dabei Kaliumhydrat. Sowohl der freie Sauerstoff wie das Kaliumhydrat könnten durch Quellung des Gewebes den Farbstoff im Gewebe lockern und so die Entfärbung begünstigen. Die Schnitte kommen einige Secunden in die Lösung und dann in Alkohol.

Als das wesentliche der Gram'schen Methode haben wir die Bildung eines widerstandsfähigen Jod-Pigments kennen gelernt, dessen Isolirung durch maximale Entfärbung durch nebenhergehende Oxydation, aber auch durch die gleichzeitige Wirkung des Jodkaliums als Salz bewirkt wird.

Analoge Versuche machte Unna mit Brom in Form von Bromdämpfen, Bromwasser, Bromkalium plus Wasserstoffsuperoxyd. Wenn diese Versuche auch theilweisen Erfolg hatten, so standen sie doch hinter den Jodversuchen weit zurück.

---

[1]) Deutsche med. Wochenschrift 1887, No. 22.

[2]) Dermatologische Studien von Unna, Heft 1, 1886.

[3]) Verhandlungen des V. Congresses für innere Medicin 1886, S. 227.

Mit Chlor dagegen hatte bereits vor Unna Lustgarten[1]) erfolgreiche Versuche gemacht. Er fand, dass die Leprabacillen, wenn sie mit Anilinwasser-Fuchsin oder Gentianaviolett gefärbt sind, einer Entfärbung mit 1 % unterchlorigsaurem Natron besser als die Tuberkelbacillen widerstehen, so dass sie noch gefärbt sind, wenn die Tuberkelbacillen (und die anderen Bakterien und die Kerne) bereits entfärbt sind. Dabei wird das Gewebe bei Fuchsin bräunlich, bei Gentianaviolett grünlich gefärbt. Bei der Anwendung von unterchlorigsauren Salzen müssen die Präparate sehr gut mit Wasser ausgewaschen werden, um eine nachträgliche bleichende Wirkung des Chlors unmöglich zu machen. Da auch die oxydirende Kraft des Chlors bei der maximalen Entfärbung betheiligt ist, so kann man nach Lustgarten zum Auswaschen statt des reinen Wassers auch reducirende Mittel benutzen. Auf jeden Fall ist der Vorgang ebenso wie bei Jod ein complicirter. Ob es sich analog dem Jod-Pigment um Bildung eines Chlor-Pigments handelt, ist noch unentschieden. Bei der maximalen Entfärbung kommt aber ebenso wie bei den Jodmethoden die Oxydation und die Salzwirkung des unterchlorigsauren Natrons mit in Frage. Andere Formen des Chlors waren bisher unwirksam.

8. Entfärbung durch oxydirende und reducirende Mittel. Schon bei der Jod- und Chlormethode konnte auf die Bedeutung der Oxydation für die Entfärbung hingewiesen werden. Hiervon ausgehend kam dann Lustgarten zu einer Methode, bei welcher er die Oxydation nicht als Nebenwirkung, sondern als Hauptfactor betrachtete, indem er die „oxydirende Eigenschaft des übermangansauren Kalis in Verbindung mit schwefliger Säure“ zum Entfärben der intensiv gefärbten Schnitte verwendete und dadurch in syphilitischen Producten eigenthümliche Stäbchenbakterien isolirte. Die mit Anilinwasser-Gentianaviolett gefärbten Präparate kommen in eine 1,5 % Lösung von Kaliumpermanganat. Es bildet sich ein flockiger brauner Niederschlag von Manganhyperoxyd. Dann lässt man eine wässrige Lösung von reiner schwefliger Säure einwirken. Das braune Manganhyperoxyd wird von der schwefligen Säure je

[1]) Die Syphilisbacillen 1885.

nach der Concentration fast momentan oder in wenigen Secunden zu Manganoxydul reducirt, die hierbei gleichzeitig durch Oxydation der schwefligen Säure entstehende Schwefelsäure verbindet sich mit diesem Manganoxydul zu dem farblosen schwefelsauren Mangan, d. h. es tritt Entfärbung ein.

Ob die Sache aber so einfach als Oxydation aufzufassen ist, ist mehr als fraglich, wie Unna mit Recht ausführt. Im Gewebe kommt der frei werdende Sauerstoff, welcher das Gewebe zur Quellung bringt und dadurch eine Lockerung des Farbstoffs bewirkt, nur beim Uebergang der Uebermangansäure in Manganhyperoxyd in Betracht. Die zweite Abgabe von Sauerstoff, beim Uebergang von Manganhyperoxyd in Manganoxydul, kommt für die Entfärbung im Gewebe gar nicht in Betracht, da sie nur in dem Maasse erfolgt, als schweflige Säure zu Schwefelsäure oxydirt wird. Neben der ersten Oxydation muss auch in diesem Falle das unzersetzt in Lösung bleibende übermangansaure Salz wie bei der einfachen Salzmethode und in den Jod- und Chlormethoden als Salz (physikalisch oder chemisch) entfärbend wirken. Die schweflige Säure endlich kann einmal als Säure entfärbend wirken, wie schon früher auseinandergesetzt wurde, und dann könnte ausserdem gerade diese Säure als reducirendes Mittel die gefärbten Anilinsalze zu ungefärbten Leukoproducten reduciren.

Dieser letztere Umstand kommt noch bei Verwendung von Oelen und Harzen in Betracht und Unna zeigte, dass besonders Nelkenöl durch Bildung von Leukoproducten entfärbend wirkt. Ein durch Nelkenöl entfärbtes Gewebe färbt sich an der Luft wieder. Lutz machte hiervon Gebrauch, indem er bei der Gram'schen Methode die erste Entfärbung durch Salpetersäure, den Rest aber durch Nelkenöl bewirkte. Bei der besonders von Kühne ausgebildeten Differenzirung durch Nelkenöl und Anilinöl könnte die Bildung derartiger Leukoproducte, d. h. nachträgliche Entfärbung leicht in Frage kommen.

Hieraus resultirt noch zum Schlusse die praktische Consequenz, dass man nach eingetretener isolirter Färbung durch maximale Entfärbung dafür zu sorgen hat, auch die letzten Spuren aller

zur Differenzirung benützten Mittel zu entfernen, und dass die Aufhellungs- und Einschlussmittel von derartigen Körpern frei sein müssen.

III. Die directen einzeitigen polychromatischen Färbungen

werden durch Verwendung von Gemischen verschiedener Farben von vorher bestimmten tinctoriellen Eigenschaften erzielt. Dieselben wurden von Ehrlich-Westphal[1]) eingeführt.

Eine Lösung aus:

Partsch-Grenacher'schem Karmin .	100 ccm,
Glycerin	100 „
conc. alkoholische Lösung von Dahlia	100 „
Eisessig	20 „

färbte gleichzeitig die Kerne roth, Bakterien und Mastzellen blauviolett.

Für Tuberkelbacillen wurde eine derartige Methode von Gibbes[2]) angegeben; 2 gr Fuchsin und 1 gr Methylenblau werden in einem Mörser verrieben, hierzu fügt man langsam eine Lösung von 3 ccm Anilinöl in 15 ccm rectificirtem Spiritus, bis das Farbstoffgemenge gelöst ist; darauf verdünnt man mit 15 ccm Wasser. Nach der Färbung erfolgt die Differenzirung durch Methylalkohol, bis keine Farbe mehr an den letzteren abgegeben wird.

IV. Die mehrzeitigen polychromatischen Färbungen.

1. Die Vorfärbung der Kerne erfolgt am besten mit einer Karminlösung, wenn man die Bakterien blau oder violett, mit einer Hämatoxylinlösung, wenn man die Bakterien roth färben will. Die in Karmin oder Hämatoxylin gefärbten Schnitte werden gründlich in Wasser ausgewaschen und dann in absoluten Alkohol übertragen. Von hier aus erfolgt die Färbung wie ad I oder II. Zur Kernvorfärbung eignet sich auch Kernschwarz, während die basischen Anilinfarben hierfür praktisch weniger geeignet sind.

---

[1]) Westphal: Ueber Mastzellen. Dissertation. Berlin 1880.

[2]) Lancet 1883, S. 771.

2. Die Differenzirung der ad I oder II gefärbten Schnitte erfolgt derartig, dass man dem zur maximalen Entfärbung dienenden Differenzirungs-Mittel eine Contrastfarbe zusetzt. B. Fränkel[1]) nahm z. B. die Differenzirung mit Fuchsin gefärbter Tuberkelbacillenpräparate vor, indem er zu 50 ccm Alkohol, 30 Wasser, 20 Salpetersäure so viel Methylenblau zugab, als sich nach wiederholtem Schütteln löste. Bei Anwendung dieser filtrirten Lösung bleiben die Tuberkelbacillen roth und gleichzeitig werden die Kerne und andere Bakterien blau gefärbt. Zur Differenzirung von blau gefärbten Tuberkelbacillen nahm er eine Lösung von 70 Alkohol, 30 Salpetersäure mit so viel Vesuvin, als sich darin löste; dadurch werden bei der Differenzirung der blauen Tuberkelbacillen die Kerne und andere Bakterien braun gefärbt. Van Ermengem[2]) differenzirte in ähnlicher Weise die mit Fuchsin roth gefärbten Tuberkelbacillen durch 50 ccm Eisessig und 20 ccm einer alkoholischen Nigrosinlösung.

Hierher gehören zum Theil auch die bereits früher besprochenen Lösungen sauerer und basischer Anilinfarben in Verbindung mit Alkohol, Säuren oder Oelen, weil dieselben nicht nur differenziren, sondern neben dieser Hauptwirkung meist oder oft noch Contrastfärbungen, besonders des Protoplasma gestatten.

3. Bei der isolirten Färbung ad I und II bleiben manche Gewebselemente ungefärbt oder sie werden wieder entfärbt. Im äussersten Falle ist nur eine Art von Bakterien gefärbt, alles andere farblos, in den meisten Fällen sind Bakterien und Kerne in der primären Farbe gefärbt und das übrige ist farblos, in einer dritten Reihe von Fällen sind Bakterien und Kerne in der ursprünglichen Farbe und einige andere Elemente durch Metachromasie in einer zweiten Farbe gefärbt. Je nach der Methode, den Arten der Bakterien und den Besonderheiten des Gewebes können demnach ungefärbt geblieben oder wieder farblos geworden sein: entweder andersartige Bakterien und Kerne gleichzeitig, oder aber Kerne allein und in beiden Fällen daneben in der Regel auch noch das

[1]) Berliner klinische Wochenschrift 1883. No. 33.

[2]) Manuel technique de Microbiologie (französische Bearbeitung meiner Methoden) 1887, S. 130.

Protoplasma. Eine Nachfärbung dieser ungefärbt gebliebenen oder wieder farblos gewordenen Gewebsbestandtheile in einer Contrastfarbe muss demnach Doppel- oder mehrfache Färbungen ermöglichen.

a) Eine Nachfärbung der durch Salzlösungen oder die Jodmethode entfärbten Kerne erfolgt am besten mit einer zweiten basischen Anilinfarbe, und zwar kommt, da diese isolirten Färbungen meist durch violette Pararosaniline erzielt werden, am häufigsten eine Nachfärbung mit wässriger Vesuvinlösung in Frage. Sind Tuberkelbacillen durch Mineralsäuren differenzirt, so erfolgt die secundäre Färbung der farblos gewordenen Kerne und anderen Bakterien bei rother Grundfarbe mit Methylenblau oder Methylgrün, bei blauer oder violetter Grundfarbe mit Vesuvin. Zur Nachfärbung der Kerne eignen sich Karmin und Hämatoxylin weniger als die basischen Anilinfarben.

b) Die Nachfärbung des Protoplasma erfolgt durch sauere Anilinfarben in Contrastfarben.

c) Die Nachfärbung der Kerne und des Protoplasma kann combinirt werden und bisweilen lässt sich ein Theil dieser Nachfärbungen ungefärbter Gewebselemente mit der Differenzirung in einem Acte vornehmen.

4. Ein anderes Princip der mehrzeitigen polychromatischen Färbungen hat Weigert[1]) eingeführt, nämlich, wie es Unna nennt, die Differenzirung durch partielle Umfärbung. Er behandelte mit wässrigem Gentianaviolett überfärbte Schnitte mit Essigsäure haltendem Pikrokarmin und dadurch verwandelte sich das Blau der Kerne in Roth, während die Bakterien die blaue Farbe behielten. Koch[2]) brachte die mit alkalischem Methylenblau behandelten Tuberkelbacillen enthaltenden Präparate ohne Intercurrenz einer Säure direct in concentrirte wässrige Lösungen von Vesuvin. Dadurch wurde die blaue Farbe der Kerne und anderen Bakterien in braun verwandelt, während die Tuberkelbacillen die blaue Farbe behielten.

---

[1]) Virchow's Archiv 1881, Bd. 84, S. 275.

[2]) Berliner klinische Wochenschrift 1882, No. 15.

Selbstverständlich konnte diese Darstellung der Methoden keine Rücksicht darauf nehmen, dass praktisch die verschiedenen Methoden in einander übergreifen, wodurch die Sonderung vielfach eine weniger schroffe wird. Dann habe ich absichtlich gar keine Rücksicht darauf genommen, dass die Härtungsmethoden vielfach an sich schon mehrfache Färbungen ermöglichen, wie dies z. B. bei den Härtungen in Chromsäure, Pikrinsäure und der Flemming'schen Lösung, augenfällig ist. Bei den Färbungen ist bisweilen keine so scharfe Grenze zwischen Kern und Protoplasmafärbung zu ziehen; in dieser Hinsicht sind die gleichzeitigen Kern- und Protoplasmavorfärbungen durch Hämatoxylin zu nennen.

---

6. Specielles über die Farben und die Herstellung der Farblösungen.

I. **Karmin und Cochenille.**

Das färbende Prinzip der Karminlösungen ist nach der gewöhnlichen Auffassung eine Säure, die Karminsäure, welche in Wasser unlöslich, dagegen in Verbindung mit Alkalien z. B. als karminsaures Ammoniak oder Natron oder in Verbindung mit Säuren z. B. als essigsaures Karmin in Wasser löslich ist. Nach Liebermann[1]) war ein von ihm untersuchtes Karmin keine derartige Verbindung, sondern eine „Thonerdekalk-Proteïnverbindung des Karminfarbstoffes" und nach P. Mayer[2]) färbte eine Verbindung, welche allenfalls als wirkliches Ammonium-Karminat bezeichnet werden konnte, nicht wie Karmin sondern wie Cochenilletinctur. Hiernach ist die ganze Frage nach der Natur des färbenden Prinzipes noch nicht entschieden und wohl kaum so einfach. Nach der obigen Annahme zerfallen die Karminlösungen in neutrale resp. alkalische und sauere. Die ersteren müssten von

[1]) Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 1886, XVIII, S. 1969.

[2]) Internationale Monatschrift für Anatomie und Physiologie 1887, IV, S. 44.

vornherein Kerne und Protoplasma anfärben, während die letzteren von vornherein reine Kernfärbungen liefern sollten. Die allgemeine Behandlung zur Karminfärbung ist die, dass man die Schnitte direct aus dem Alkohol oder, nachdem man dieselbe aus Alkohol in destillirtes Wasser gebracht hat, aus dem destillirten Wasser in die Karminlösung bringt und sie darin minuten- bis stundenlang lässt; in einzelnen Lösungen kann man sie selbst tagelang ohne Gefahr der Ueberfärbung lassen. Die gefärbten Schnitte werden in destillirtem Wasser, welches öfters erneuert wird, gründlich ausgewaschen, bis das Wasser rein bleibt, und kommen dann zum Entwässern in absoluten Alkohol. Bei den Karminlösungen, welche von vornherein keine reinen Kernfärbungen geben, bringt man die Schnitte um reine Kernfärbungen zu erhalten in eine Säurelösung. Zu diesem Zwecke dient:

a) Salzsäure nach Grenacher: 70 Alkohol absol., 30 Aq. dest., 1 reine Salzsäure. In dieser Säure bleiben die Schnitte ca. 5 Minuten liegen, werden dann unter öfterem Erneuern in destillirtem Wasser gründlich ausgewaschen und darauf in Alkohol entwässert.

b) Essigsäure oder Ameisensäure von 1 %, sonst wie bei Salzsäure.

1. Sogenanntes karminsaures Ammoniak (Hartig, Gerlach, Maschke) wird in concentrirter wässriger Lösung vorräthig gehalten, weil ältere Lösungen in Folge der Bildung kohlensauren Ammoniaks und Entweichen freien Ammoniaks besser beizen. Hiervon giebt man einige (2—5) Tropfen in ein Uhr-Schälchen mit destillirtem Wasser.

2. Karminsaures Natron in trockner Form (Maschke) wird unter Zusatz von etwas doppelkohlensaurem Ammoniak in concentrirter Lösung gerade wie die vorausgegangene Lösung verwendet.

3. Lösung nach Beale:

Karmin	10
Liq. Ammon caust.	3,75
Glycerin	60
Aq. dest.	60
Alkohol	15.

Das Karmin wird in Probierröhrchen mit dem Ammoniak übergossen, geschüttelt, dann einige Minuten gekocht. Darauf lässt man abkühlen und setzt nach einer Stunde das übrige hinzu; zu filtriren. Sollte allmählich Karmin ausfallen, so muss man 1 bis 2 Tropfen Ammoniakflüssigkeit zusetzen. Gut zum Durchfärben ganzer Stücke in ca. 8 Tagen.

4. Alaun-Karmin nach Grenacher: Eine wässrige 1 bis 5 % Lösung von Alaun oder Alaun-Ammoniak wird mit 0,5 bis 1 % gepulvertem Karmin 20 Minuten gekocht und nach dem Erkalten filtrirt. Reine Kernfärbung ohne Ueberfärbung in 10 Minuten bis 2 Stunden, dann Wasser ohne Säure.

5. Alaun-Karmin nach Partsch-Grenacher: Karmin pur. 2, Aq. dest. 200, Alaun 5,0 werden 15 Minuten gekocht, nach dem Erkalten filtrirt und dann mit 1 % Karbolsäure versetzt.

6. Borax-Karmin nach Grenacher: Eine 2 % Boraxlösung wird mit 0,5 bis 0,75 Karmin gekocht und nach dem Erkalten tropfenweise mit verdünnter Essigsäure versetzt, bis die Färbung der gewöhnlichen Karminlösung erreicht ist. Färben 5—30 Minuten, dann ca. 1 Minute Salzsäure-Alkohol, dann Wasser, wenn reine Kernfärbungen bezweckt werden.

7. Salzsäure-Karmin nach P. Mayer: 4 gr Karmin wird in 15 ccm Wasser und 30 Tropfen Salzsäure durch Kochen gelöst, dann fügt man 95 ccm Alkohol von 85 % hinzu und neutralisirt mit Ammoniak; man vermeidet dadurch das Kochen des Alkohols. Färbung in 5 bis 10 Minuten.

8. Salzsäure-Karmin: 50 ccm eines 60 bis 80 % Alkohol werden mit 4 Tropfen Salzsäure und 0,5 Karmin versetzt, 10 Minuten gekocht und nach dem Erkalten filtrirt; 6 und 8 besonders zum Durchfärben ganzer Stücke geeignet.

9. Lithion-Karmin nach Orth: 2,5 Karmin werden in 100 kalt gesättigter Lösung von kohlensaurem Lithion gelöst; Färben 2—3 Minuten, dann $^1/_2$—1 Minute Säurespiritus, dann Wasser.

10. Pikro-Karmin nach Ranvier und Weigert ist für Anfänger etwas schwieriger als die einfachen Karminfärbungen.

Karmin 1,0 Liquor Ammon. caust. 5,0, Aq. dest. 50; nach erfolgter Lösung Zusatz von 50,0 gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung. Man lässt in offenen Gefässen bis zum Verdunsten des Ammoniaks stehen und filtrirt dann. Färben 1 Stunde; $^1/_2$ Stunde Auswaschen in 1 $^0/_0$ Salzsäureglycerin, das durch Pikrinsäure leicht gelb gefärbt ist; 5 Minuten Auswaschen in Wasser, welches durch Pikrinsäure leicht gelb gefärbt ist; Entwässern in durch Pikrinsäure gelb gefärbtem Alkohol.

11. Pikro-Lithion-Karmin. Zu der Lithionkarminlösung (9) werden 2 Theile gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung hinzugesetzt. Färbung wie bei 10.

12. Um den Vortheil dieser Färbung, bei welcher die Kerne roth, das Protoplasma (besonders Muskelfasern, Bindegewebe, Fibrin, Colloid) diffus gelb werden, bequemer zu erreichen hat Huber folgende Modification für Pikro-Lithion-Karmin vorgeschlagen. Die Schnitte kommen aus dem Alkohol einige Minuten in dest. Wasser, dann 24 Stunden in Lithion-Karmin, darauf direct (ohne Abspülen) 2 Stunden lang in Salzsäurehaltigen Alkohol (Grenacher). Darauf werden sie 5 Minuten in dest. Wasser ausgewaschen, einige Minuten in absol. Alkohol entwässert und dann so lange in eine verdünnte alkoholische Pikrinsäurelösung von blass citronengelber Farbe eingelegt, bis die Schnitte diese Farbe angenommen haben. Danach auswaschen in absol. Alkohol bis keine Farbe mehr ausgeschieden wird.

Statt des Karmins kann man auch die Cochenille selbst verwenden, besonders bei schwer durchlässigen Objecten und bei alkoholischen Tincturen.

1. Nach P. Mayer: Cochenille-Tinctur. Grob zerkleinerte Cochenille wird mit 70 $^0/_0$ Alkohol übergossen und bleibt mehrere Tage stehen; auf je 1 gr Farbstoff kommen 8 bis 10 ccm Alkohol. Nach der Filtration ist die Tinctur sofort brauchbar. Die zu färbenden Objecte müssen vor der Färbung einige Zeit in 70 $^0/_0$ Alkohol gelegen haben. Schnitte

blieben bis zu 15 Minuten, grössere Stücke bis einige Tage in der Tinctur; für Schnitte wird die Tinctur vortheilhaft mit 70%igem Alkohol verdünnt. Die Differenzirung der gefärbten Schnitte erfolgt mit demselben 70% Alkohol, dem bei Ueberfärbung allenfalls 0,1% Salzsäure oder 1% Essigsäure zugesetzt werden können. Ungekehrt wird durch Zusatz von Ammoniak oder kaustischen Alkalien die Farbe tief purpurroth.

2. Alaun-Cochenille: 7 gr Cochenille und 7 gr gebrannten Kalialaun verreibt man fein in einer Reibschale, fügt 700 ccm Wasser zu, kocht bis auf 400 ccm ein und fügt nach dem Abkühlen eine Spur Karbolsäure zu, filtrirt einige Mal; vor jedem Gebrauch ist zu filtriren. Färbung von Alkoholpräparaten bis 5 Minuten, von Chromsäurepräparaten 3 bis 5 und mehr Stunden.

II. **Hämatoxylin**

ist als Kern- und Protoplasmafärbungsmittel oft dem Karmin vorzuziehen. Es hat den einen Nachtheil, dass es leichter überfärbt. Man kann diesen Fehler durch Säurebehandlung zwar ausgleichen, doch leisten diese Präparate nicht vollständig dasselbe, wie von Anfang an vorsichtig gefärbte Präparate. Die Schnitte kommen aus dem zum Schneiden dienenden Alkohol in destillirtes Wasser und erst aus diesem in die Farblösung, in der sie etwa 5 bis 10 Minuten bleiben. Dann müssen sie gründlich bis zu mehreren Stunden in destillirtem Wasser ausgewaschen werden und kommen dann zum Entwässern in absoluten Alkohol. Sind nun die Kerne überfärbt, (statt blau schwarzblau bis schwarz, wodurch manche Dinge in den Zellen verdeckt werden), so kann man die Schnitte in eine 0,5% Alaunlösung bringen, bis die richtige blaue Färbung eingetreten ist. Das Auswaschen muss in einem solchen Falle noch viel gründlicher, mindestens 24 Stunden lang geschehen. Waren ausser den Kernen auch Protoplasma und Bindegewebe gefärbt, so bringt man die Schnitte zur Erzielung einer reinen Kernfärbung in die Salzsäure (Grenacher), darauf folgt wieder gründliches und langes Ab-

spülen im Wasser, dann Alkohol. Gerade die höchst scharfen und doch wenig verdeckenden Protoplasmafärbungen, welche man mit Hämatoxylin erzielen kann, sind zur Beurtheilung der Beziehungen von Bakterien zu den Zellen vielfach als die besten Protoplasmafärbungen zu betrachten.

In Dauerpräparaten scheint öfters durch nachträgliche chemische Umsetzungen eine ungünstige Beeinflussung der mit basischen Anilinfarben erzielten Bakterienfärbungen durch Karmin und Hämatoxylin einzutreten. Ob hierbei aber nicht vielleicht Harze oder Reste von Oelen durch Bildung von Leukoproducten betheiligt sind, ist mir nicht ganz klar, da ich alte derartige Präparate besitze, welche sich vorzüglich gehalten haben. Möglich ist es aber auch, dass Karmin und Hämatoxylin den basischen Anilinfarben gegenüber bei längerer Einwirkung und nicht ganz scharfer maximaler Entfärbung als Differenzirungsmittel wirken.

1. Lösung von Böhmer: a) 0,35 gr Hämatoxylin in Krystallen werden in 10 gr absol. Alkohol gelöst. Diese braune alkoholische Stammflüssigkeit hält man sich am besten vorräthig, da sie frisch weniger wirkt. Nach der Bereitung bleibt die Lösung 3 bis 4 Tage am Lichte stehen, bis sie nicht mehr dunkler wird. Vor dem Gebrauch filtrirt man sich jedesmal die nöthige Menge. Von dieser Lösung (a) werden in einem Schälchen so viele Tropfen in die öfters frisch zu bereitende Lösung (b) gegeben, bis eine tief blauviolette Flüssigkeit entsteht. Die Lösung (b) besteht aus Alumen depur. 0,1 in 30 Aq. dest.
2. Lösung von Friedländer:

Hämatoxylin	2
Aq. dest. Alkohol und Glycerin āā . .	100
Alaun	2

3. Lösung von Delafield: Um 600 ccm Lösung zu erhalten, nimmt man 400 ccm concentrirte wässrige Lösung von Ammoniakalaun und fügt 4 gr krystallisirtes Hämatoxylin, welches in 25 cc absolutem Alkohol gelöst ist, hinzu. Durch 3—4 tägiges Stehen im Lichte in einer offenen Flasche dunkelt die Farbe genügend nach. Darauf wird die Lösung filtrirt und 100 ccm

Glycerin und 100 ccm Methylalkohol zugefügt und diese fertige Lösung muss in gut verschlossener Flasche aufbewahrt werden. Zum Gebrauche verdünnt man sie mehr oder weniger mit Wasser, je nachdem man schneller oder langsam färben will. Für unsere Zwecke ist eine schwächere Lösung nach dem Vorhergesagten meist vorzuziehen.

III. Kernschwarz

wird von Platner[1]) ein nicht näher bekannter, in Lösung zu beziehender Farbstoff genannt, welcher in schwächeren Concentrationen Kerne, Nebenkerne, Kernkörperchen und Achsencylinder färbt, während er in der gewöhnlichen concentrirten Lösung auch Protoplasma, Bindegewebe und Markscheide in schwächerer Nuance mitfärbt. Der Farbstoff soll eine an eine organische Säure gebundene Metallbase sein und erfordert zur Differenzirung Alkalien, entweder 5 bis 6 Tropfen Ammoniak auf ein Uhrschälchen Wasser oder eine concentrirte wässerige Lösung von Lithion carbonicum, welche man je nach dem Zwecke mit Wasser verdünnen kann. Die Schnitte kommen aus dem Alkohol nach H. Kühne am besten einige Minuten in ein mit 3 bis 4 Theilen Wasser verdünntes Kernschwarz, werden dann mit verdünntem kohlensaurem Lithion bis zum Entstehen einer hellgrauen Farbe ausgezogen und in Alkohol entwässert.

IV. Sauere Anilinfarben.

Bei den Versuchen, die Anilinfarben zu gruppiren, macht sich eine gewisse Unsicherheit selbst bei den Farbchemikern geltend. Den gleichen Fabrikmarken entspricht nicht immer das gleiche Präparat. Viele Präparate sind keine chemischen Individuen, sondern Gemische verwandter Farben. Viele Präparate werden für den Handel „gestellt“, z. B. mit Dextrin. Das Fabrikgeheimniss umgiebt wegen der Patentgesetzgebung die Darstellung mancher Farbstoffe und vielfach begegnet man Mittheilungen, welche geradezu zum Irreführen der Concurrenz bestimmt sind.

---

[1]) Zeitschrift f. wissenschaftl. Mikroskopie 1887, Bd. IV., S. 349.

Von im histologischen Sinne saueren Anilinfarben kommen in Betracht:

1. Phtaleïne. Unter denselben sind zu nennen Fluoresceïn, wasserlösliches röthliches Eosin (Bromverbindung), wasserlösliches bläuliches Eosin (Jodverbindung), Phloxinroth.
2. Nitrokörper. Naphthalingelb = Martiusgelb, Pikrinsäure, Aurantia.
3. Sulfosäure. A) Aus Anilinölen.
   I. Oxydationsproducte des reinen Anilin:
      Indulin, Nigrosin.
   II. Oxydationsproducte eines Gemisches von Anilin und Tuluol:
      Fuchsin S = Säurefuchsin = Rosanilinsulfosäure.
   III. Methylirte Rosaniline:
      Säureviolett = Violett S.
   IV. Phenylirte Rosaniline:
      Wasserlösliches Anilinblau.
   V. Azofarbstofie:
      Goldorange (Orange III), Tropaeolin 00 (Orange IV), Congo, Benzopurpurin.

   B) Naphthalingruppe und zwar Oxyo-azo-Verbindungen:
      Tropaeolin 000 No. 1. (Orange I), Tropaeolin 000 N 2 (Orange II), Azoblau.
4. Primäre Farbsäuren, wie Rosolsäure, Alizarin, Purpurin, haben bis jetzt in der Bakteriologie noch keine Verwendung gefunden.

V. Basische Anilinfarben.

A) Aus Anilinölen bereitet.

I. Oxydationsproducte des reinen Anilin:
   Methylenblau, Chlorhydrinblau (= basisches Indulin?).

II. Oxydationsproducte des reinen Toluol:
   Safranin.

III. Oxydationsproducte eines Gemisches von Anilin und Toluol:
   a) Rosaniline. Das reine farblose Rosanilin ist Triamidodiphenyl-toluyl-karbinol.

1. Fuchsin = salzsaures Rosanilin. Im Handel ist dasselbe häufig als Gemisch von essigsauerem und salzsauerem Rosanilin zu treffen und häufig ist es ausserdem mit salzsaueren und essigsaueren Pararosanilinen gemischt. Man sollte deshalb versuchen, immer das reine salzsauere Rosanilin zu erhalten,

Azaleïn = salpetersaueres Rosanilin.

2. Methylirte und äthylirte Rosaniline:

Jodviolett; Dahlia = bläuliche Nuance des Jodviolett und oft mit Dextrin verunreinigt; röthliche Nuancen des Methylviolett (Violett 5 R = mehrfach äthylirtes Rosanilin, Violett 5 R B = mehrfach methylirtes Rosanilin); Jodgrün.

b) Pararosaniline. Das farblose reine Pararosanilin ist Triamido-triphenyl-karbinol.

1. Rubin = salzsaueres Pararosanilin. Hier gilt dasselbe wie bei Fuchsin und die Namen Rubin, Fuchsin werden oft ganz willkürlich gebraucht.

2. Methylirte, äthylirte und benzylirte Pararosaniline:

Krystallviolett = Hexa-Methyl P.; Methylviolett B (Gemenge von Methyl-Pararosanilinen); Aethylviolett; bläuliche Nuancen des Methylviolett (5 B und 6 B sind benzylirte P.); Gentianaviolett ist benzylirtes Methylviolett, welches mit Dextrin gestellt ist; Viktoriablau; Methylgrün; Auramin.

Die Rosaniline lassen sich schwerer rein darstellen als die Pararosaniline und sind meist mit letzteren gemischt. Die Pararosaniline färben ceteris paribus schärfer als die Rosaniline.

IV. Amido-azo-Verbindungen:

Bismarckbraun = Phenylenbraun = Vesuvin.

V. Chinolin-Derivate:

Cyanin.

B) Naphthalingruppe. Magdalaroth.

Ein neuerdings von H. Kühne verwendetes und gerühmtes „Schwarzbraun“ ist mir bis jetzt noch nach seiner Stellung unbekannt geblieben und sei anhangsweise erwähnt.

Bis jetzt dienen nur die basischen Anilinfarben zur Bakterienfärbung. Die Beobachtung von Birch-Hirschfeld, dass sich lebende Typhusbacillen in zwei sauren Farben, Benzopurpurin und Phloxinroth, färben und einige Beobachtungen, welche ich über Färbungen von Bakterien in Schnitten mit Eosin mehr zufällig machte, lassen erwarten, dass man unter Umständen bei richtiger Wahl der Beizen auch vielleicht die saueren Anilinfarben noch besser verwerthen lernt.

Die Anilinfarben werden verwendet[1]):

1. Als concentrirte wässrige Lösungen. Dieselben werden entweder direct benutzt oder in beliebigem Grade mit destillirtem Wasser verdünnt. Man bereitet sich dieselben am besten jedesmal frisch und filtrirt nach dem Erkalten.
2. Concentrirte alkoholische Lösungen. Die Lösung eines Ueberschusses von Farbstoff erfolgt am besten mit absolutem Alkohol oder in Ermangelung desselben mit dem offizinellen 90%igen Spiritus der Pharmacopoe. Im Allgemeinen kann man ca. 20—25 gr Farbstoff auf 100 gr Spiritus oder Alkohol rechnen. Diese Lösungen werden vorräthig gehalten und dienen nicht direct, sondern in bestimmter Mischung mit destillirtem Wasser zur Färbung; nach Ehrlich's Versuchen färben nämlich Lösungen der Farbstoffe in absolutem Alkohol (aber auch in anderen Extractionsmitteln, wie reinem Glycerin) überhaupt keine Bakterien und Kerne. Statt der concentrirten wässerigen Lösungen kann man sie verwenden, wenn man 5—6 Tropfen zu einem kleinen Uhrglase mit destillirtem Wasser giebt; diese Mischung bezeichne ich im Folgenden kurz als verdünnte alkoholische Lösung.

   Für Chlorhydrinblau giebt H. Kühne an, das man 10 gr mit 10 ccm absolutem Alkohol mischen und 90 Wasser zufügen soll. Von Viktoriablau wird 1 gr in 50 ccm 50% Alkohol gelöst.

   Fluoresceïn und Eosin werden zu 1—2% in absolutem Alkohol gelöst und Eosin bisweilen vortheilhaft in mit Wasser stark

[1]) Für einige Einzelheiten, besonders der Schnittfärbungen, verweise ich noch auf H. Kühne: Praktische Anleitung zum mikroskopischen Nachweis der Bakterien im thierischen Gewebe. 1888.

verdünnten, leicht rosa gefärbten alkoholischen Lösungen verwendet.

3. Vesuvin, Bismarckbaun, Anilinbraun sind im Allgemeinen nicht in alkoholischen Lösungen zu verwenden. Können sie nicht in wässerigen, jedesmal zu filtrirenden Lösungen angewandt werden, so wird eine concentrirte Lösung in gleichen Theilen Glycerin und Wasser[1]) hergestellt.

4. Alkalische Lösungen von Methylenblau.

a) schwache von Koch[2]):

1 ccm concentrirte alkoholische Lösung von Methylenblau,
200 ccm destillirtes Wasser,
0,2 ccm einer 10 %igen Kalilauge;

b) starke von Löffler[3]):

30 ccm concentrirte alkoholische Lösung von Methylenblau,
100 ccm Kalilauge 1: 10000.

5. Anilinwasser nach Ehrlich[4]). Gereinigtes Anilinöl wird in Ueberschuss mit destillirtem Wasser etwa 1 Minute geschüttelt (ca. 5 ccm Anilinöl mit 100 ccm Wasser), wobei sich bis zu 3 oder 4 % lösen, dann nach 5 Minuten langem Stehen durch ein vorher mit destillirtem Wasser angefeuchtetes Filter filtrirt. Das Filtrat muss wasserklar sein und dient statt Wasser als Menstruum. Da dieses gesättigte Anilinwasser sehr schnell herzustellen ist, bereitet man sich dasselbe am besten jedesmal frisch. Will man es haltbar machen, so setzt man demselben nach B. Fränkel 5—10 % Alkohol zu oder löst 3 ccm Anilinöl in 7 cm Alkohol und fügt 90 ccm destillirtes Wasser hinzu.

Für die meisten Fälle ist es am bequemsten, wenn man nach Ehrlich dem klaren Anilinwasser „von einer gesättigten alkoholischen Fuchsin- oder Methylviolettlösung so lange hinzufügt,

---

1) Koch: Verfahren zur Untersuchung. Beiträge zur Biologie der Pflanzen 1877. Bd. II, 3. Heft, S. 406.

2) Berl. klin. Wochenschrift 1882, No. 15; Mittheilungen aus dem Gesundheitsamte 1884, Bd. II, S. 5.

3) Mittheilungen 1881, Bd. II, S. 439.

4) Deutsche med. Woschenschrift 1882, No. 19.

bis eine deutliche Opalescenz der Flüssigkeit eintritt, die die Sättigung mit Farbstoff anzeigt". Oft ist das Zufügen der concentrirten wässerigen Lösung bis zur Erreichung derselben Farbe besser.

Für bestimmte Zwecke empfiehlt sich bei häufiger Anwendung folgende Modification der Ehrlich'schen Lösung nach Weigert-Koch[1]), welche aber nach 10—12 Tagen erneuert werden muss, weil allmählich ihr Farbenvermögen abnimmt.

100 ccm gesättigtes Anilinwasser,
11 ccm concentrirte alkoholische Lösung von Methylviolett oder Fuchsin,
10 ccm absoluter Alkohol.

6. Statt Anilin kann, wie früher erwähnt, in ähnlicher Weise wie Anilinöl als Menstruum dienen Toluidin (B. Fränkel[2]), ebenso Terpentin (Prior[3]); ferner 5 %ige wässrige Karbolsäure (Ziehl[4]) oder ½ %iges Ammoniak (Weigert[5]), ebenso Borax (Sahli[6]) 1 % Ammonium carbonicum (H. Kühne[7]), 1 p. m. Thymol in Wasser (Brieger-Klemperer[8]).

Die betreffenden Lösungen werden oft in folgenden Formen verwendet:

a) Ammoniak:	Liq. ammon. caust.	0,5
	Alkohol absolut.	10,0
	Aq. dest.	90,0
	Gentianaviolett	2,0
b) Karbolsäure	nach Ziehl, modificirt von Neelsen[9]):	
	Fuchsin	1,0
	Alkohol absolut.	10,0
	5 % wässrige Karbolsäure	100,0

1) Mittheilungen aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt, Bd. II, 1884, S. 6.
2) Berl. klin. Wochenschrift 1884, No. 13.
3) Berl. klin. Wochenschrift 1883, No. 33.
4) Deutsche med. Wochenschrift 1882, S. 451. 1883, S. 12 und 247.
5) Deutsche med. Wochenschrift 1883, S. 351.
6) Zeitschrift f. wissenschaftliche Mikroskopie 1885, Bd. II, S. 49.
7) Zeitschrift f. Hygiene 1886, I, S. 553.
8) Deutsche med. Wochenschrift 1885, S. 810.
9) cfr. Johne, Fortschritte der Medicin 1885, S. 201.

Das Fuchsin wird erst mit Alkohol übergossen und dann die Karbollösung zugefügt.

Ebenso wird Karbol-Schwarzbraun hergestellt.

c) Für Methylenblau giebt H. Kühne[1]) folgende Vorschrift: 1,5 Methylenblau werden in einer Reibschale mit 10 absolutem Alkohol übergossen und dann unter Vermeidung zu starken Aufdrückens unter allmählichem Zusatz von 100 ccm 5 % Karbolsäure verrieben und gelöst.

d) Borax

Destillirtes Wasser	. . . .	40,0
Gesättigte wässrige Lösungen von Methylenblau	. . . .	24,0
5 % Boraxlösung	. . . .	16,0

7. Die Lösungen in Nelkenöl oder Anilinöl werden nach H. Kühne derart dargestellt, dass man eine Messerspitze des Farbstoffs in einer Reibschale mit 10 ccm Oel verreibt. Das ganze kommt unfiltrirt in ein Fläschchen, auch wenn nicht alles gelöst ist. Das Oel wird nach einiger Zeit durch Sedimentiren klar und man setzt von dem gefärbten klaren Oel in einem Schälchen so viel zu reinem Oel derselben Art, bis die gewünschte Nuance erreicht ist.

Andere Reagentien,

welche bis jetzt noch nicht genau angegeben sind, aber öfter gebraucht werden:

a)

Jod	. . . .	1,0
Jodkalium	. . . . .	2,0
Dest. Wasser	. . . . .	300,0

oder man löst 2 Jod, 4 Jodkalium in 100 Wasser und fügt davon zum Gebrauche so viel in dest. Wasser, bis eine Madeirafarbe entsteht (H. Kühne).

b) Salpetersäure, Salzsäure und Schwefelsäure werden bis zu 25 % in wässriger Lösung gebraucht; man stellt sich die nöthige Concentration schnell her, wenn man 5 bis 6 Tropfen in ein kleines Schälchen mit dest. Wasser giebt.

---

[1]) Praktische Anleitung zum mikroskopischen Nachweis der Bakterien im thierischen Gewebe 1888, S. 42.

c) Zum etwaigen Entkalken dient folgende öfters zu wechselnde Flüssigkeit nach von Ebner:

Salzsäure	0,5
Alkohol	100,0
Aq. dest.	20,0
Chlornatrium	0,5

d) Essigsäure dient in $^1/_2$ bis $1\,^0/_0$iger Lösung zur Erzielung der maximalen Entfärbung und zum Aufsuchen ungefärbter Bakterien.

e) Kalium- und Natriumhydrat werden in 1 bis $3\,^0/_0$iger Lauge zum Sichtbarmachen ungefärbter Bakterien verwendet, oder indem man 1 bis 2 Tropfen der sonst in der Histologie viel gebrauchten $33\,^0/_0$igen Kali- oder Natronlauge zu einem Uhrschälchen Wasser giebt.

f) Glycerin und Alkohol sind immer in reinstem, völlig säurefreiem Material zu verwenden.

g) Destillirtes Wasser, welches zu bakteriologischen Arbeiten dient, ist immer vorher durch stundenlanges Kochen oder in einem der Sterilisirungsapparate zu sterilisiren, da das gewöhnliche destillirte Wasser immer Bakterien und deren Keime enthält. Alle zur Bakteriologie dienenden Lösungen sind mit sterilisirtem, destillirtem Wasser anzusetzen und alle Lösungen und Reagentien vor ihrer Anwendung auf etwaigen Gehalt an Bakterien zu prüfen.

Zum Aufbewahren der Lösungen dienen Flaschen mit eingeschliffenen Stöpseln und für den Tagesbedarf sehr bequem kleine Glasflaschen, deren eingeschliffener hohler Stöpsel oben mit Gummikappe versehen ist und unten in eine Capillare ausläuft, welche gestattet, beliebig grosse und beliebig viele Tropfen sauber zu entnehmen.

Zum Conserviren von Bakterienpräparaten kann Glycerin nur bei den braunen Farben dienen, weil es die übrigen Anilinfarben mehr oder weniger schnell extrahirt; für die braune Farbe kann man die Klebs'sche Glycerin-Gelatine anwenden.

Von concentrirten Lösungen von essigsaurem Kali (1 : 2) kann man zum Conserviren gefärbter und ungefärbter Bakterienpräparate oft vortheilhaft Gebrauch machen.

Die universellsten hierher gehörigen Conservirungsmittel sind Damarharz und Canadabalsam, die man sich sehr bequem in durch Terpentin oder besser in durch Xylol flüssigem Zustande in Tuben hält. Zum Verdünnen des Canadabalsams darf nur gereinigtes Terpentinöl (Terpentingeist) oder Xylol verwendet werden, weil Chloroform die basischen Anilinfarben extrahirt. Canadabalsam ist für das Farbenbild, Damarharz für das Structurbild vorzuziehen, weil das Lichtbrechungsvermögen des letzteren etwas geringer ist, als das des Canadabalsams. Altmann empfiehlt den Copaivabalsam, den man unverdünnt benutzen kann und dessen Brechung genau der der Deckgläser gleich kommt.

Zum Aufhellen ist wegen des Ausziehens der Anilinfarben das beliebte Nelkenöl möglichst zu vermeiden und statt desselben Terpentinöl, Cedernholzöl oder Begamottöl zu verwenden.

Zum Bezuge der Farben und Chemikalien empfehle ich ausser den früher genannten mikroskopischen Firmen noch besonders: Dr. Grübler-Leipzig und König-Berlin.

---

7. Deckglas-Präparate.

Nachdem schon früher beobachtet war, dass die morphologischen Elemente des Blutes in dünner Schicht angetrocknet sich meist nicht wesentlich ändern, nachdem bereits Ehrenberg das Trocknen von Mikroorganismen erfolgreich verwendet und Obermeyer sich dieses Verfahrens bei den Recurrensspirochaeten bedient hatte, verwandte Koch[1]) diese mehr zufälligen Beobachtungen zuerst methodisch zur Bakterien-Forschung. Er breitete ein Tröpfchen der bakterienhaltigen Flüssigkeit auf einem Deckglase zu einer ganz dünnen Schicht aus, wodurch die einzelnen Elemente annähernd in eine Ebene gebracht

[1]) Verfahren zur Untersuchung etc. Beiträge zur Biologie der Pflanzen 1877. II. 3. Heft. S. 399.

wurden. Diese dünne Schicht wurde dann durch einfaches Trocknen an der Luft fixirt. Um kleine Gestaltsveränderungen, welche dabei auftraten, wieder aufzuheben, wurde es nöthig, nachträglich wieder eine Quellung eintreten zu lassen. Blieb die lufttrockene Schicht aber zu lange in dem hierzu benutzten Wasser oder Glycerin, so löste sie sich ganz auf, statt nur etwas aufzuquellen.

Wurde das Deckgläschen mit der lufttrockenen Schicht in absoluten Alkohol oder 0,5 %ige Chromsäure gelegt, so wurde die Schicht in Wasser und Glycerin unlöslich, aber sie quoll nicht mehr genügend auf. Wurde aber die unlöslich gewordene Schicht in essigsaures Kali gebracht, so quoll sie genügend auf, ohne sich abzulösen, und alle Formen erschienen vielfach wie im natürlichen Zustande. Ebenso wirkten die Lösungen der Anilinfarben, welche die erwünschte Quellung hervorriefen ohne die Schicht abzulösen und noch ausserdem die Bakterien färbten.

Bei Anwendung dieser Methode aut die Blutuntersuchungen fand Ehrlich,[1]) dass das schnelle Antrocknen eine Coagulation der Zellalbuminate ausschloss und dass die natürliche Färbbarkeit der Elemente erhalten blieb; nur das Hämoglobin wurde durch die wässrigen und glycerinigen Farblösungen extrahirt. Wurden aber die lufttrocknen Präparate eine bis mehrere Stunden einer Temperatur von 115 bis 125° ausgesetzt, so hatten alle Elemente des Blutes ohne wesentliche Alteration, ohne Auftreten von Kunstprodukten, ihr electives Färbevermögen behalten. In Folge dieser Beobachtung wandte Koch, statt des umständlichen Fixirens durch Alkohol, das Erhitzen auch auf die Bakterienpräparate an,[2]) aber nur wenige Minuten.

Ein Tröpfchen der bakterienhaltigen Flüssigkeit wird je nach der Menge der morphologischen Bestandtheile unverdünnt oder unter Zusatz eines Tröpfchens destillirten Wassers mit einem vorher ausgeglühten und wieder abgekühlten Skalpell oder Platindraht zu einer flachen Schicht auf dem Deckglase ausgebreitet und ein Ueberschuss von Flüssigkeit nach dem Rande gestrichen und dort mit Fliesspapier abgesaugt.

---

[1]) Zeitschrift f. klin. Med. Bd. I. S. 553.

[2]) Zur Untersuchung von pathogenen Organismen. Mittheilungen aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte 1881, Bd. I, S. 1.

Oder man legt auf das Deckgläschen mit dem Tröpfchen ein zweites Deckgläschen, welches durch seinen Druck die Schicht gleichmässig flach ausbreitet. Zieht man dann mit Pinzetten beide Deckgläschen von einander, so hat man gleich zwei Präparate. Bakterien, welche sich auf festen Substraten befinden, werden mit einem Tröpfchen keimfreiem Wasser verrieben. Das Deckgläschen bleibt, gegen Staub geschützt, a) bis zum völligen Trockensein ruhig stehen oder kann b) in einem Exsiccator etwas schneller getrocknet werden. Beschleunigen kann man das Antrocknen auch, indem man c) das mit der Pinzette gefasste Deckgläschen, mit der Präparatenseite nach oben, hoch über der Gasflamme, gegen deren directe Wirkung geschützt, hin und her bewegt, oder indem man sich d) des Verfahrens von H. Kühne bedient. Hierzu wird ein mit einem capillar ausgezogenen Glasröhrchen armirter Hand-Spray benutzt. Man richtet mit dem Spray durch das capillare Ende des Glasrohrs senkrecht auf das feuchte Deckglas einen Strom Luft von mässiger Stärke, welcher nicht nur trocknend wirkt, sondern auch das Material in gleichmässiger Schicht auf dem Deckglase auszubreiten gestattet; das schnelle Verfahren c) empfiehlt sich für eiweissfreies und eiweissarmes d) für eiweissreiches Material, wie z. B. Sputum. Die Schicht auf einem Deckglase soll nicht dick, aber sie braucht auch nicht hauchartig dünn zu sein, aber gleichmässig muss sie sein, damit alle Prozeduren auf alle Theile gleich einwirken.

Will man ganze Colonien in situ auf einem Deckgläschen präpariren, so kann man einen an der unteren Seite des Deckgläschens hängenden Tropfen von Nährlösung oder Nährgelatine in später zu schildernder Weise impfen und lässt nach eingetretenem Wachsthum die ganze Schicht langsam antrocknen oder man lässt ein sterilisirtes Deckgläschen vorsichtig auf eine Colonie fallen und versucht schonend die Colonie mit dem Deckgläschen abzuheben. Das Antrocknen muss sehr vorsichtig an der Luft oder im Exsiccator geschehen. Die letztere Präparationsweise wurde 1881 von Koch und mir eingeführt, blieb aber fast unbeachtet. In den letzten Jahren sind diese Präparate als „Klatschpräparate" bekannter geworden; diese Präparate sind selbstverständlich nie so gleichartig

wie die ersteren. Nur lufttrockene Präparate dürfen weiter behandelt werden.

Schon auf die so getrocknete Schicht kann man zum Färben einen Tropfen der Farblösung geben, aber nur für den Fall, dass die Flüssigkeit eiweissfrei ist und die Färbung schnell erfolgt, da bei längerer Einwirkung die Schicht allmählich ganz losgelöst wird. War die nur getrocknete Schicht eiweisshaltig, Blut, Gewebesaft, Sputum, so entstehen bei Zusatz der Farblösung ausserdem oft Niederschläge.

Es wird deshalb meist nöthig, die lufttrockene Schicht durch Erhitzen sicher zu fixiren, einzubrennen. Man kann zu diesem Zwecke die Deckgläschen mit der angetrockneten Schicht in einen Trockenschrank bringen oder auf eine Kupferplatte legen. Ein solches Kupferblech legt man auf einen Dreifuss und erhitzt dasselbe an einem Ende durch eine Gasflamme, so dass die verschiedenen Theile, je nachdem sie näher oder entfernter von der Flamme sind, verschieden hohe Temperaturen annehmen. Für Bakterienpräparate genügen bis zu 10 Minuten bei 125 bis 130° C. oder 10 bis 20 Minuten bei 110°.

Noch bequemer, und bei einiger Uebung auch eben so sicher, ist es nach Koch-Löffler, wenn man das Deckgläschen, mit der angetrockneten Schicht nach oben, dreimal unter stetiger Bewegung mässig schnell durch eine nicht leuchtende Gas- oder Spiritusflamme von mittlerer Grösse zieht und zwar derart, dass die Hand eine horizontale Kreisbewegung macht und zwar so schnell, dass ein Kreisabschnitt von ca. 1 Fuss jedesmal in einer Sekunde zurückgelegt wird.

Der Grund hierfür liegt nach Koch[1]) in der Beobachtung, dass bei den nicht erhitzten Präparaten die oben geschilderten Missstände sich bemerkbar machen, bei ein- bis zweimaligem Durchziehen die Fixirung, besonders bei starkem Eiweissgehalt, nicht für alle Fälle genügt, während bei dem dreimaligen Durchziehen durch die Flamme die Formen sich nicht wesentlich ändern, ihre Färbbarkeit behalten und die Albuminate so unlöslich geworden sind, dass sich

[1]) Mittheilungen 1884. Bd. II. S. 7.

keine Niederschläge mehr bilden; noch öfteres Durchziehen setzt die Färbbarkeit für die Bakterien wieder herab (cfr. Sporen-Färbung). Das Misslingen der Präparate, welches erst nach einiger Uebung aufhört, scheint wesentlich darin begründet, dass die Präparate von Anfängern meist schon erhitzt werden, ehe sie vollständig lufttrocken geworden sind. Waren die Präparate noch etwas wasserhaltig, so tritt Coagulation der Albuminate ein, während bei vollständig wasserfreien Präparaten dies nicht geschieht, sondern das Eiweiss durch das Erhitzen „homogenisirt" wird.

Wenn ein Material gar kein Eiweiss oder demselben gleichwerthige Schleimstoffe enthält, so kann das Fixiren und Homogenisiren der Schichte sehr erschwert werden. In solchen Fällen z. B. bei Urin vermischt man die bakterienhaltige Flüssigkeit nach von Sehlen[1]) mit einem Tröpfchen Eiweisslösung. Gleiche Theile Eiweiss und kalt gesättigte (4 %) Borsäurelösung werden hierzu gemischt und dann filtrirt.

Bei sehr ungleichartiger Beschaffenheit des zu prüfenden Materials, z. B. bei sehr zähem Sputum, ist oft eine andere Vorbereitung des Materials vor dem Auftragen auf die Deckgläser nöthig. Man mischt nach Stroschein[2]) eine concentrirte Lösung von Borax oder Borsäure im Verhältniss von 1 zu 3 Wasser. Hiervon setzt man je nach der zähen oder weniger zähen Beschaffenheit des Sputums, Eiters etc. das gleiche bis dreifache Volumen zum Sputum und schüttelt in einem mit eingeschliffenem Stöpsel versehenen Mischcylinder von ca. 100 cm Inhalt ungefähr eine Minute gründlich durch, bis sich keine gröberen Flöckchen mehr zeigen. Die geschüttelte Flüssigkeit giesst man in ein Spitzglas, welches zugedeckt 24 bis 48 Stunden zur Sedimention stehen bleibt. Dann giesst man die obere klare Flüssigkeit ab und benutzt den, die sedimentirten Bakterien enthaltenden gleichmässigen Bodensatz zur Untersuchung. Da die Borsäure eine Vermehrung der Bakterien nicht zulässt, so kann man sich dieses Verfahrens ebenso sicher zu

---

[1]) Centralblatt für Bakteriologie 1888, IV. No. 22.

[2]) Mittheilungen aus Brehmer's Heilanstalt für Lungenkranke in Görbersdorf 1889 I, S. 285.

quantitativen Versuchen bedienen, wie der Entnahme aus rein wässrigen Lösungen, wenn man sich zur Entnahme nicht eines Platindrahtes, sondern einer geaichten Pipette bedient. Das Ausstreichen und Vertheilen des Materials auf dem Deckglase erfolgt durch Platindraht und (oder) Spray. Das Kochen mit Lauge nach Biedert liefert keine so guten Präparate.

Milchpräparate hellt man von der Färbung oft vortheilhaft mit 1 % Essigsäure auf, die dann wieder gut ausgewaschen werden muss.

Das lufttrockene und durch Einbrennen fixirte Präparat wird nun gefärbt. Man legt a) das Deckgläschen mit der Präparatenseite nach oben auf ein Stück Fliesspapier und bringt mit einem Glasstabe oder einer Capillarröhre oder dem zur Capillare ausgezogenen Glasstöpsel einige Tropfen Farblösung auf das Präparat. Die Farblösung bleibt eine bis zehn Minuten darauf, indem man durch Neigen des Deckglases sieht, ob das Präparat schon Farbe angenommen hat. Soll die Farblösung länger einwirken, so bringt man nicht die Farblösung tropfenweise auf das Deckglas, weil sich beim Trocknen am Rande des Farbtropfens ein schwer entfernbarer Farbenring bildet, sondern man gibt b) eine entsprechend grössere Menge der Farblösung in ein Uhrglas oder Krystallisationsschälchen. Dann fasst man das Deckgläschen, die Präparatenseite nach unten gekehrt, lose zwischen eine Pinzette oder zwischen Daumen- und Zeige- oder Mittelfinger, und lässt es flach auf die Oberfläche der Farblösung fallen, so dass es mit der Präparatenseite auf der Farblösung schwimmt. Zur Verhütung der Verdunstung deckt man dann eine Glasplatte oder eine zweite Schale darüber.

Zur Abkürzung oder zur Steigerung der Itensität der Färbung kann man die Farblösung erwärmt anwenden, indem man c) nach Koch das Schälchen mit Farblösung und schwimmendem Deckglase im Trockenschrank auf etwa 50 bis 60° erwärmt; oder indem man d) nach Rindfleisch das mit schwimmendem Präparat versehene Schälchen mit der Zange fasst und über kleiner Flamme bis zum Auftreten von Blasen erwärmt; oder e) indem man die Farblösung im Reagirglase aufkocht, dann erst in das

Schälchen giesst und dann das Deckglaspräparat auf dieser heissen Farblösung zum Schwimmen bringt, oder f) indem man das Deckglas, mit der Präparatenseite nach oben, mit Farblösung bedeckt und dann mit einer Pinzette fasst und mit dieser über eine kleine Flamme hält, bis eben Blasenbildung stattfindet; während dieses etwa 1 Minute anhaltenden Siedens muss stets das Deckglas mit Farblösung bedeckt bleiben; man muss also ev. mit einer Pipette etwas Farblösung nachgeben.

Zur Entfernung des überschüssischen Farbstoffes richtet man entweder den Strahl einer Spritzflasche, bei schräg gehaltenem Deckglase, etwas oberhalb des Präparates, welches direct vom Wasserstrahl nicht getroffen werden darf; oder man schwenkt das mit der Pinzette gefasste Deckglas in einem mit destillirtem Wasser gefüllten Becherglase hin und her; oder man saugt den überschüssigen Farbstoff mit Fliesspapier ab, fügt einige Tropfen Wasser hinzu, saugt von Neuem ab und wiederholt dies bis kein Farbstoff mehr an das Fliesspapier abgegeben wird. Dann wird das Deckglaspräparat in einem Tropfen Wasser untersucht. Zu diesem Zwecke bringt man einen Tropfen destillirtes oder sterilisirtes Brunnenwasser, oder 0,5 % Kochsalzlösung auf den gereinigten Objectträger, auf den man die Präparatenseite des Deckglases legt, welches durch seine Schwere den Tropfen richtig ausbreitet; ein Ueberschuss von Wasser wird seitlich mit Fliesspapier abgesaugt. Die obere Seite des Deckglases wird durch Absaugen mit Fliesspapier oder Blasen mit einer Capillarröhre von jeder Spur Wasser befreit, weil sie den Oeltropfen für die homogene Immersion aufnehmen muss, und dann nach den S. 55 gegebenen Vorschriften das Einstellen und Beobachten vorgenommen, wobei nur zu beachten ist, dass es sich um ein Farbenbild handelt, also mit offenem Condensor beobachtet wird.

Sollen die Deckglaspräparate conservirt werden, so wird das Immersions-Oel mit Fliesspapier (und event. Chloroform) wieder entfernt, das Wasser durch vorsichtiges Erwärmen oder besser durch ruhiges Stehenlassen (geschützt gegen Staub, event. im Exsiccator) verdunstet, und das getrocknete Präparat direct in Canadabalsam eingelegt, indem man die Präparatenseite des Deckglases auf einen

Tropfen Balsam fallen lässt, den man auf den Objectträger gegeben hat. Zum besseren Aufhellen ist es bisweilen zu empfehlen, das lufttrockene, gefärbte Deckglaspräparat über einer Flamme leicht zu wärmen, dann einen Tropfen Xylol darauf zu bringen, welchen man wieder ablaufen lässt. Dann erst lässt man das Deckglas mit der Präparatenseite auf den Tropfen Balsam fallen.

Es sind bei jeder Bakterienart verschiedene Farben anzuwenden, da einzelne nur die Bakterien, andere gleichzeitig die feinen Gallerthüllen, andere Kapseln mitfärben. Die entstehenden Bilder sind deshalb nicht bei allen Farben und Färbemethoden gleich, so dass es eigentlich selbstverständlich sein sollte, bei Vergleichen immer nur identisch behandelte Präparate zu benützen. Diese Momente müssen bei der Wahl der Farblösung leiten. Man hat dementsprechend zu unterscheiden zwischen der Färbung zu einem ganz bestimmten Zwecke, zur Nachprüfung oder Anwendung von Färbemethoden, welche für bestimmte Fälle als beste geschildert oder erwiesen sind, und der orientirenden Färbung zum Nachweise der Anwesenheit von Bakterien überhaupt.

Da in Deckglaspräparaten fast alle Bakterien in wässrigen Lösungen der basischen Anilinfarben tingibel sind, so nimmt man zunächst gesättigte wässrige Lösungen oder die gleichwerthigen verdünnten alkoholischen Lösungen.

Die gesättigten wässrigen Lösungen haben für diese Orientirung den Vorzug, für alle bewährten basischen Anilinfarben anwendbar zu sein, so dass man mit wenigen Präparaten schon verschiedene Farben versuchen kann. Hat man trotz der vermutheten Anwesenheit von Bakterien auf diese Weise keine Bakterien zu Gesicht bekommen, so nimmt man Anilinwasser oder Karbolsäure mit Methylviolett oder Fuchsin, oder Methylenblau in Karbolsäure oder alkalischer Lösung.

In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle gestaltet sich demnach die **orientirende Untersuchung** auf Anwesenheit von Bakterien:

1. Antrocknen in dünner Schicht;
2. Fixiren, indem das Deckglas dreimal durch die Flamme gezogen wird;

3. Färben durch einige Tropfen concentrirter wässriger oder verdünnter alkoholischer Lösung basischer Anilinfarben;
4. Entfernen des überschüssigen Farbstoffs durch Abspülen oder Absaugen;
5. Untersuchen in einem Tropfen destillirtem Wasser bei offenem Condensor.

Zur **isolirten Färbung** von Bakterien in Deckglaspräparaten kann man die gefärbten Deckglaspräparate ungefähr 1 Minute in eine zur Hälfte gesättigte Lösung von kohlensaurem Kali legen. Waren sie mit Violett in Anilinwasser oder 1 $^0/_0$ kohlensaurem Ammoniak oder mit Viktoriablau gefärbt, so entfärbt man die übrigen Elemente nach der Methode von Gram[1]). Die gefärbten Deckgläser werden zu diesem Zwecke etwa 1 Minute in die Jod-Jodkaliumlösung gelegt, dann sofort in absoluten Alkohol gebracht, bis das Präparat entfärbt erscheint; der Alkohol wird abgewaschen und das Präparat in Wasser angesehen. Hierbei bleiben einige Arten von Bakterien nicht nur gefärbt, sondern sie werden sogar ganz dunkelblau, während andere Arten entfärbt werden, so dass oft eine Differentialdiagnose erleichtert oder überhaupt erst möglich wird.

Gefärbt bleiben hierbei beispielsweise die Eitererreger (alle Staphylokokken und der Streptokokkus pyogenes), der mit letzterem identische Str. Erysipelatis, Tuberkel- und Leprabacillen, B. des Schweinerothlaufs (Mäuseseptikaemie), die Milzbrandbacillen, Actinomycesparasiten, Diplokokkus (lanceolatus) der Pneumonie (von Talamon — Fränkel — Weichselbaum), Rhinosklerom, Tetanus, M. tetragenus.

Entfärbt werden dagegen beispielsweise die Gonokokken, Syphilisbacillen (Lustgarten), B. des malignen Oedems und Rauschbrandes, Cholera- und Recurrens-Spirochaeten, Kapselbakterien der Pneumonie (Friedländer), Rotzbacillen, Typhusbacillen, Diphtheriebacillus, Septikaemia haemorrhagica, Hogcholera (= Schweinepest).

---

[1]) Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten. Fortschritte der Medicin II. 1884, No. 6.

Bei diesen und den folgenden Färbeverfahren wird immer vorausgesetzt, dass, wenn auch ein Theil der Manipulationen im Stande ist, Formveränderungen der Bakterien herbeizuführen, ein anderer Theil der Manipulationen diesen Fehler wieder aufhebt. Dies ist aber nur in gewissem und nach der Präparationsweise schwankendem Grade der Fall. Besonders die zum Studium mancher Formverhältnisse, z. B. der Gliederung von Scheinfäden und Schrauben vorzugsweise verwendeten Eingriffe, wie Antrocknen und der Zusatz der hierzu wichtigsten Reagentien, wie Jod, Alkohol und Pikrinschwefelsäure, zeigen in Folge ihrer Einwirkung auf die Membranen eine etwaige Gliederung mehr oder weniger deutlich. In der Regel wird die Gliederung auch dadurch deutlicher, dass diese Reagentien auch den Inhalt innerhalb der Membran zum Schrumpfen bringen, dass sie ferner oft Körnelungen des Inhaltes und das Auftreten von Kunstproducten bewirken. Man muss in derartigen Fällen den Werth dieser Alterationen durch vergleichende Beobachtungen festzustellen und dieselben womöglich zu compensiren suchen, was aber kaum in ausreichendem Grade gelingt. Wendet man bei der Gram'schen Methode nach Lutz rauchende Salpetersäure bis zu 50% an, so kann man Leprastäbchen in Kokken „auflösen." Aehnlich ist es, wenn man Jod in statu nascendi nach Unna durch Vermischen von Wasserstoffsuperoxyd mit Jodkaliumlösung entwickelt. Während aber Unna und Lutz der Ansicht sind, dass es sich in diesem Falle um das Aufdecken einer natürlichen Structur handelt, dürften wohl die meisten Morphologen den starken Eingriff für ungeeignet halten, um feine Formeigenthümlichkeiten zu enthüllen, und eher geneigt sein den von Unna gewählten Ausdruck „auflösen" wörtlich zu nehmen in dem Sinne, dass Dinge künstlich durch eine coagulirende Wirkung dargestellt werden unter Beeinträchtigung und theilweiser Auflösung der natürlichen Formverhältnisse. Aus derartigen Gründen hat man solche eingreifende Mittel bisher nur gewählt, um relativ grobe Formeigenthümlichkeiten aufzudecken und um diagnostische und differenzialdiagnostische Anhaltspunkte zu gewinnen, aber nicht um feinere Structurverhältnisse zu ermitteln.

Jod ist in Form der Jodtinctur, der Jod-Jodkaliumlösung und

der Entwickelung durch Vermischen von Wasserstoffsuperoxyd mit Jodkalium geeignet als Reagens für Amylum, Amyloid, corpora amylacea, Cholestearin, besonders aber auch für die Granulosekörner, welche einige Bakterien, wie Leptothrix buccalis, Clostridium butyricum, zeigen.

Als mikrochemisches Reagens auf Cellulose, welche in der Membran mancher Bakterien enthalten ist, dienen Jodpräparate. Alte Cellulose färbt sich mit frisch dargestelltem Jodwasser nicht oder in einem bräunlichen Ton, enthält aber das Jodwasser Jodsäure, so tritt Blau- bis Violettfärbung ein. Zusatz eines Tropfens Schwefelsäure (oder Aetzkali) zu einem mit Jodwasser imprägnirten Präparate ruft Blaufärbung hervor, während Salzsäure und Salpetersäure keine Blaufärbung bewirken. Chlorzinkjodlösung färbt reine Cellulose immer. Man mischt den Bakterientropfen mit einem Tropfen Chlorzinkjodlösung, wartet einen Moment und legt dann das Deckgläschen auf; etwaige Amylumkörner sind dann tief blau, die Cellulosehüllen röthlich-violett.

Cuprammoniumoxyd bringt reine Cellulose gallertartig zum Quellen, während incrustirte Cellulose dadurch nicht gelöst wird.

Um die Kapseln, welche einige Bakterien zeigen, sichtbar zu machen, verwendet man nach Ribbert[1]) vortheilhaft eine Mischung aus 100 Wasser 50 Alkohol, 12 ½ Eisessig, welche in der Wärme mit Dahlia gesättigt wird. Die Deckglaspräparate werden eben mit dieser Lösung in Berührung gebracht und sofort in Wasser abgespült. Die Pneumonie-Kokken sind dunkelblau, die Kapseln hellblau, während bei längerer Einwirkung Kokken und Kapseln so tief gefärbt sind, dass die Kokken nicht scharf zu erkennen sind. Um die Kapseln auch durch andere Färbungen leicht zu finden, empfiehlt Friedländer die Gelatinekulturen dieser Bakterien vor der Färbung einige Minuten in warmer Bouillon von ca. 35° zu suspendiren.

Zu **Doppelfärbungen** an Deckglaspräparaten kann man die nach der Gram'schen Methode entfärbten Präparate aus dem Alkohol etwa eine Minute in eine schwache wässrige Vesuvinlösung

[1]) Deutsche med. Wochenschrift 1885, S. 136.

bringen und dann wieder mit Wasser abspülen, dann bleiben die Bakterien blau, oft fast blauschwarz, während die Kerne braun gefärbt werden. Man kann auch die roth (oder blau) gefärbten Präparate einige Minuten in Hämatoxylin (oder Karmin) bringen, doch haben diese Doppelfärbungen bei Deckglaspräparaten viel geringeren Werth als bei Schnittpräparaten.

Nur in wenig Fällen haben dieselben ein grosses praktisches Interesse gewonnen, zum

Nachweis der Tuberkelbacillen im Sputum und zur Differenzialdiagnose dieser Bakterien.

Man könnte diese Präparate nach dem Gram'schen Verfahren färben, aber es werden dann die Tuberkelbacillen und viele andere Bakterien blau gefärbt, im Gegensatze zu den braunen Kernen. Zur Differenzialdiagnose ist dies aber nicht genügend und man wendet deshalb für diesen Zweck ausschliesslich das von Koch ermittelte Prinzip an, die Tuberkelbacillen in einer anderen Farbe zu färben, als die übrigen Bakterien und die Kerne. Koch gelang dies, indem er die Präparate 24 Stunden in der schwachen alkalischen Methylenblau-Lösung (S. 109) liess, und dieselbe dann kurze Zeit in concentrirte wässrige Vesuvin-Lösung brachte; es waren dann die Tuberkelbacillen (und die Leprabacillen) blau, alle anderen Bakterien und die Kerne braun gefärbt. Nachdem dieses wichtige Prinzip gefunden war, lehrte Ehrlich in dem Anilinwasser ein noch besseres Mittel zur Steigerung der Färbungsintensität kennen und ermittelte, dass in mit Anilinwasserfarbe gefärbten Präparaten die Tuberkelbacillen einem Entfärben mit Salpetersäure widerstanden, während alle übrigen Bakterien durch diese Mineralsäure entfärbt wurden. Man darf aber dickere Präparate nicht so lange in der Säure liegen lassen, bis vollständige Entfärbung eingetreten ist, weil dann auch viele und allmählich alle Tuberkelbacillen entfärbt werden. Man lässt dieselben so lange in der Säure, bis der rothe (Fuchsin) oder blaue (Methylviolett) Ton in Gelbroth (resp. grünlich-blau) übergegangen ist. Bringt man in diesem Stadium die Präparate in Wasser, so tritt wieder rothe resp. blaue Färbung ein; durch Einwirkung der Säure waren die einfach saueren Ver-

bindungen (roth resp. blau) in die dreifach saueren (gelbroth resp. blaugrün) übergeführt; bei Wasserzutritt zerfallen die dreifach saueren Verbindungen wieder und es entsteht wieder der rothe resp. blaue Ton. Man spült deshalb die durch Säure entfärbten Präparate nicht in Wasser, sondern in 50 bis 60 %igem Alkohol ab. Dann färbt man mit verdünnter, wässriger Lösung von Methylenblau oder Methylgrün für die rothgefärbten (resp. Vesuvin für die violettgefärbten Präparate) nach, um eine Contrast- und Grundfärbung zu erhalten. Nach dem Abspülen des Methylenblau oder Methylgrün resp. Vesuvin werden die Präparate in Wasser untersucht oder nach Entfernen des Wassers in Canadabalsam conservirt. Trotz dieser ganzen Procedur behalten die Tuberkelbacillen ihre rothe (resp. blaue) Farbe und sind so leicht unter den übrigen Bestandtheilen zu erkennen. Ausser diesem differential-diagnostischen Effect der Doppelfärbung (Contrastfärbung) hat das Nachfärben in einer andern Farbe den Vortheil der leichteren Einstellung des Präparates (Grundfärbung). Tafel II, Fig. 9.

Ueber die Entnahme des bacillenhaltigen Materials aus Cavernen oder tuberkulösem Eiter ist zu bemerken, dass käsige Massen mit sterilisirtem Skalpell dünn ausgestrichen werden. Tuberkelknötchen müssen mit dem Skalpell (event. erst zwischen zwei Skalpellen) zerquetscht und dann auf dem Deckglase ganz flach gedrückt werden. Aus dem Sputum werden nicht die wasserklaren, sondern die zähen, gelblichen Massen benutzt, aus demselben mit Platinnadel oder Skalpell Partikel entnommen und auf dem Deckglase flach ausgestrichen oder durch Auflegen eines zweiten Deckglases breit gedrückt, so dass man nach Auseinanderziehen beider Deckgläser mit Pinzetten zwei Präparate hat. Das Trocknen und gleichmässige Ausbreiten der zähen Sputumschicht kann man durch Aufblasen von Luft durch eine feine capillare Glasspitze mit Hülfe eines damit verbundenen Handgebläses beschleunigen. Ueber andere Vorbereitung des Sputums cfr. S. 117.

Das ganze Verfahren ist nach Koch[1]), unter Adoption des von Ehrlich eingeführten Anilinwassers, kurz:

---

[1]) Mittheilungen Bd. II, S. 10.

1. Deckglaspräparate getrocknet, nach dem Trocknen dreimal durch die Flamme gezogen;
2. Färben mit der Weigert-Koch'schen Lösung von Methylviolett (oder Fuchsin) in Anilinwasser, 12 Stunden lang;
3. Behandeln in verdünnter Salpetersäure (1 zu 3 bis 4) einige Secunden;
4. Spülen in 60%igem Alkohol durch mehrmaliges Hin- und Herbewegen;
5. Nachfärben in wässriger Lösung von Vesuvin (oder Methylenblau oder Methylgrün) etwa eine Minute;
6. Abspülen; Untersuchen in Wasser.

B. Fränkel suchte das Verfahren zu vereinfachen, indem er sauere alkoholische Lösungen von Methylenblau oder Vesuvin herstellte, a) für blau: 50 Alkohol, 30 Wasser, 20 Salpetersäure, so viel Methylenblau, als sich nach wiederholtem Schütteln löst, zu filtriren; b) für braun: 70 Alkohol, 30 Salpetersäure und so viel Vesuvin, als sich löst, zu filtriren. Unter Verwendung dieser Lösung ergiebt sich folgendes Verfahren: Man erhitzt ca. 5 ccm Anilinwasser in einem Reagirglase zum Kochen, giesst dasselbe in ein Uhrglas oder Schälchen und fügt zu diesem heissen Anilinwasser so viele Tropfen einer concentrirten alkoholischen Lösung von Fuchsin oder Methylviolett, bis eine kräftige opalescirende Farbe entsteht. Auf dieser warmen Lösung lässt man das Deckglaspräparat schwimmen, und zwar, trotzdem die meisten Tuberkelbacillen schon in 2 bis 3 Minuten gefärbt sind, der Vorsicht halber 5 bis 10 Minuten. Aus dieser Farblösung kommen die roth resp. blau gefärbten Präparate in blaue resp. braune sauere alkoholische Lösung. Das Präparat erscheint nach 1 bis 2 Minuten in der letzteren Farbe gefärbt, wird dann in Wasser oder essigsauerem ($^1/_2$%) 50%igem Alkohol abgespült und in Wasser untersucht.

Die noch einfachere Methode von Gibbes (S. 96), bei welcher Färbung und Contrastfärbung gleichzeitig auf dem Wege der Election angestrebt wird, ist nicht zuverlässig genug.

Wer mit Orth die Salzsäure vorzieht, kann sich folgenden Verfahrens nach Kaatzer bedienen: Färben wie vorher, dann Ent-

färben mit Mischung von 100 ccm 90 %igem Alkohol, 20 ccm Wasser und 20 Tropfen concentrirter Salzsäure; Nachspülen mit 90 %igem Alkohol zum Entfernen der Säure; Nachfärben mit concentrirter wässriger Lösung von Methylenblau resp. Vesuvin.

Im Sputum finden sich nach Celli und Guarnieri[1]) bisweilen feinste Fettnadeln, welche sich der Färbung gegenüber fast genau so verhalten wie Tuberkelbacillen, „Pseudobacillen", welche aber bei einiger Aufmerksamkeit wegen der verschiedenen Grösse nicht mit ihnen zu verwechseln sind und durch Aether und Chloroform aufgelöst werden. Ebenso verhalten sich Sporen und Mundepithelien ähnlich wie die Tuberkelbacillen.

Die bis jetzt mitgetheilten Modificationen der auf Koch's Prinzip der Doppelfärbung begründeten Methoden sind so zahlreich, dass ich wegen derselben auf einige zusammenfassende Darstellungen verweisen muss.[2])

Für die ärztliche **Praxis,** für Kliniken und Untersuchungsstationen empfehle ich statt der bis jetzt betrachteten, zum Verständnisse des Ganges der Forschung und der Grundsätze nothwendigen, die folgenden Verfahren.

Das Beschicken der Deckgläser mit frischem Sputum erfolgt nach S. 115; bakterienarmes Sputum oder Material, welches vergleichend geprüft werden soll, wird nach S. 117 vorbereitet und mit calibrirter Pipette, welche mit Watteptopf oder Saugapparat armirt ist, um eine Berührung des Mundes zu vermeiden, ein Tropfen ent-

---

[1]) Intorno alla profilassi della tubercolosi. Arch. per le scienze mediche 1883. Vol. VII, S. 233. Sopra talune forme cristaline che potrebbero simulare il bacillo del tubercolo. Accad. dei Lincei Juni 1883.

[2]) Kaatzer: Die Technik der Sputum-Untersuchung auf Tuberkel-Bacillen. 2. Auflage. 1885.
B. Fränkel: Ueber die Färbung des Koch'schen Bacillus. Berl. klin. Wochenschrift 1884, No. 13.
Baumgarten: Beitrag zur Darstellungsmethode der Tuberkel-Bacillen; Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie I, 1884, S. 51.
H. Kühne: Centralblatt für Bakteriologie 1890. VIII. No. 10.
Czaplewski: ibid. No. 22.
H. Hermann: Annales de l'Institut Pasteur 1889. III. S. 160.

nommen, der gleichmässig mit Platindraht und Spray auf dem Deckglase ausgebreitet und schnell angetrocknet wird. Das Einbrennen der Präparate erfolgt in gewöhnlicher Weise.

Als Farblösung dient die Karbolsäure-Fuchsin-Lösung nach Ziehl-Neelsen. Die Färbung ist in der Kälte in 5 Minuten fertig, durch Erwärmen des Deckglases über der Flamme kann die Zeit auf eine Minute abgekürzt werden, doch werden die Bilder der kalt behandelten Präparate bei Karbolsäure meist reiner.

Die Differenzirung der Tuberkelbacillen erfolgt nunmehr:

A. Nachweis der Tuberkelbacillen allein nach H. Kühne. Von den mit Karbolsäure-Fuchsin roth gefärbten Deckgläsern lässt man den Farbüberschuss auf Fliesspapier ablaufen und bringt dann das Präparat, je nach der Dicke der Schnitte, 2—5 Secunden in Mineralsäure (1 : 10 Wasser; nicht in die starken 25 % Mischungen). Bei richtiger Behandlung erscheinen dünne Sputumschichten vollständig entfärbt, bei dickeren Schichten ist es besser das vollständige Entfärben zu vermeiden und aus der Säure zu nehmen, wenn der rothe Farbenton als solcher ganz geschwunden ist. Dann wird das Deckglas gründlich mit Wasser abgespült und mit Hülfe des Gebläses schnell getrocknet.

Nunmehr bringt man auf einen Objectträger ein Tropfen Pikrinsäure-Anilinöl (2—3 Tropfen des concentrirten Oels zu einem Blockschälchen reinem Oel), legt das Deckglas mit der Präparatenseite auf, saugt überschüssig vorhandenes Oel seitlich ab. Die Beobachtung selbst erfolgt wie gewöhnlich. Bei grösserem Gehalt an Bacillen heben sich diese sofort als rothe Stäbchen scharf vom gelben Grunde ab. Bei wenig Bacillen kann man sich das Einstellen oder Aufsuchen erleichtern, wenn man erst unter entsprechender Abblendung den Grund als Structurbild einstellt und dann erst die Blenden entfernt.

B. Nachweis der Tuberkelbacillen neben anderen Bakterien. I. Die Färbung mit Karbolfuchsin und die Entfärbung in Säure ist geradeso wie bei A, nur braucht man

die Säure noch weniger einwirken zu lassen, weil die Differenzirung durch Alkohol und eine Contrastfarbe beendigt wird. Das Präparat wird aus der Säure sofort in 60 % Alkohol gebracht (am besten stellt man zwei Schälchen mit solchem Alkohol vor sich, von denen das eine zum unmittelbaren Eintauchen aus der Säure benutzt wird, um diese ganz zu entfernen, während das zweite demgemäss reinen säurefreien Alkohol enthält), und darin kurz hin- und herbewegt. Dann lässt man den Alkohol ablaufen, giesst auf das mit der Präparatenseite nach oben gelegte Deckglas einen Tropfen der conc. wässrigen Methylenblaulösung (oder Methylgrün). Nach ca. 1 Minute ist die Contrast- und Grundfärbung fertig und das Methylenblau wird mit Wasser abgespült. Die Beobachtung erfolgt in einem Tropfen Wasser. Die Tuberkelbacillen (allenfalls auch einige Sporen und Plattenepithelien des Mundes) erscheinen nunmehr roth auf blauem Grund und daneben sind andere Bakterien gleichfalls blau gefärbt. Die Zahl der rothen Tuberkelbacillen erscheint stets etwas geringer als bei A.

II. Differenzirung der Tuberkelbacillen unter Vermeidung von Mineralsäuren nach Czaplewski: Die Färbung erfolgt wie bei A und B I; dann lässt man das Karbolfuchsin abtropfen und taucht das Präparat (ohne es abzuspülen) 6—10 mal hintereinander in Fluoresceïn-Methylenblau [Gelbes Fluoresceïn in conc. alkoholischer Lösung, der Methylenblau bis zur Sättigung zugesetzt ist], wobei man diese Farbe jedesmal langsam ablaufen lässt. Darauf verfährt man ebenso ca. 10 mal mit conc. alkoholischer Lösung von Methylenblau. Nun wird schnell mit Wasser abgespült und das Präparat in Wasser beobachtet. Auf eine der Methoden arbeite man sich gut ein.

Am besten ist es, bei frischem Sputum sich sofort nach B I oder II über Tuberkelbacillen und andere Bakterien zu orientiren. In allen schwierigen Fällen aber und zur Controlle daneben die Methode A zu verwenden.

Für diejenigen, welche die rothe Färbung nicht lieben, empfiehlt sich das Verfahren von M. Hermann. Die Farblösung wird hergestellt, indem man von einer Lösung, a) welche aus 1 Krystallviolett in 30 Alkohol besteht, in einem Glasschälchen so viel zu einer b) 1 % Lösung von kohlensaurem Ammoniak beifügt, dass eine gesättigte Farbe entsteht. In dieser Lösung bleiben die Präparate mindestens 1 Minute, werden dann 4—5 Sekunden in Mineralsäure (1:10) differenzirt, in Alkohol getaucht und in Wasser abgewaschen und in Wasser untersucht, oder, wenn man eine Contrast- und Grundfärbung wünscht, aus dem Alkohol eine halbe Minute in eine Lösung von 1 Eosin zu 100 Theilen 60 % Alkohol getaucht, mit Alkohol schnell abgespült, dann in Wasser abgewaschen und angesehen.

Sollen die Präparate conservirt werden, so werden sie nach der Beobachtung in Wasser getrocknet und in Balsam übergeführt. Alle Präparate sofort in Balsam zu bringen, ist überflüssig, da man nur wichtige Präparate aufzuheben pflegt.

Zur Beurtheilung der Befunde nach folgende Bemerkung: Nach der Färbung erscheinen die sog. Tuberkelbacillen je nach der Methode bald als gleichmässig, bald als ungleichmässig gefärbte Stäbchen. Je nach dem Stadium der Entwicklung und den von den Gewebezellen und Säften auf diese Stäbchen ausgeübten Einflüssen, sind die Stäbchen länger oder kürzer, mehr oder weniger gekörnt, oft derart, dass sie wie eine Kette von, durch helle Lücken, unterbrochenen Körnern erscheinen. Oft bilden die Stäbchen Fäden und dabei findet man Formen, welche so aussehen, als sei der Faden von einer gemeinsamen derberen Scheide umgeben, innerhalb welcher die homogenen oder gekörnten Einzelstäbchen bald dicht aufeinanderfolgen, bald unter einander verschoben sind, so dass ungleichmässige Lücken auftreten. Endogene Sporen sind bis jetzt nicht sicher nachgewiesen. Die angeblichen Sporen waren meist Lücken (Vacuolen in den Einzelzellen und Lücken in den Scheiden); vielfach wurden auch andere chromogene Elemente (Chromatinkörner) als Sporen angesprochen. In den

Riesenzellen und alten Culturen sind ausserdem noch abweichende Degenerations- und Involutionsformen beobachtet worden.

Bei der äusserst schwierigen Beurtheilung dieser Dinge ist es rathsam, sich zunächst auf die ungefähre Feststellung der Zahl der Tuberkelbacillen und die Angabe der besonderen Erscheinungsform zu beschränken.

Bei diesen Methoden verhalten sich die **Leprabacillen,** wie die Tuberkelbacillen, von denen sie morphologisch ausserdem nicht ganz leicht auseinander zu halten sind. Die Differential-Diagnose durch Färbung gründet sich bis jetzt darauf, dass sich die Leprabacillen viel leichter färben, als die Tuberkelbacillen und in Bezug auf die Leichtigkeit der Aufnahme von Farbstoffen kaum von irgend einer Art übertroffen werden, während sie der Abgabe des Farbstoffs gegenüber sich sehr resistent verhalten. Nach Baumgarten[1]) lässt man das Deckglas-Trockenpräparat 6 bis 7 Minuten in verdünnter alkoholischer Fuchsinlösung (5 bis 6 Tropfen concentrirter alkoholischer Lösung in einem Uhrglase destillirten Wassers) oder auch in concentrirter wässriger Fuchsinlösung schwimmen, entfärbt $^1/_4$ Minute in sauerem Alkohol (1 Theil Salpetersäure zu 10 Theilen Alkohol), spült die Säure in destillirtem Wasser ab, färbt in wässrigem Methylenblau nach, spült ab, untersucht in Wasser. Die Leprabacillen erscheinen dann als rothe Stäbchen auf blauem Grunde, während Tuberkelbacillen in dieser Zeit bei dieser Behandlung noch keine Farbe angenommen haben.

Allerdings hatten Lichtheim und de Giacomi gezeigt, dass man auch Tuberkelbacillen ohne Alkali und Anilinwasser schon in verdünnten alkoholischen Lösungen nach kurzer Zeit färben kann, und Baumgarten stellte fest, dass man sie selbst in rein wässrigen Lösungen von Violett und Fuchsin färben kann, doch in der Kälte nur, wenn man sehr lange färbt, oder in kurzer Zeit nur durch gleichzeitiges Erwärmen der Farblösungen.

Nach Neisser, Kühne und Bordoni-Uffreduzzi färben sich die Leprabacillen in Methylenblau sehr schlecht und schwer, doch

---

[1]) Ueber Untersuchungsmethoden zur Unterscheidung von Lepra- und Tuberkel-Bacillen. Zeitschrift f. w. Mikroskopie I. 1884, S. 367.

gelingt es, wie Koch bereits ermittelt hatte, sie schliesslich auch mit dieser Farbe zu färben; doch färben sich zweifellos die Tuberkelbacillen in dieser Farbe, sowohl bei Alkalizusatz als bei Karbolsäurebeize, leichter als die Leprabacillen.

Nach Lustgarten[1]) widerstehen die Leprabacillen, wenn sie mit Anilinwasser-Fuchsin oder Gentianaviolett gefärbt sind, einer Entfärbung mit 1 $^0/_0$ unterchlorigsaurem Natron besser als die Tuberkelbacillen, so dass sie noch gefärbt bleiben, wenn die Tuberkelbacillen bereits entfärbt sind. Bei der Anwendung von unterchlorigsauren Salzen müssen die Präparate sehr gut mit Wasser ausgewaschen werden, um eine nachträgliche bleichende Wirkung des Chlor unmöglich zu machen. Da möglicherweise auch die oxydirende Kraft des Chlor bei der Entfärbung betheiligt ist, kann man statt des Wassers auch reducirende Mittel zum Auswaschen benutzen.

Für Tuberkel- und Leprabacillen ist demnach nach eingetretener Färbung das Verhalten zum Entfärbungsverfahren und vor allem die Säurefestigkeit fast gleich. Ungleich ist jedoch die Aufnahmefähigkeit für die Farben und zwar sind die Leprabacillen sehr schnell und sicher zu färben, während die Tuberkelbacillen die relativ schwierigst zu färbenden Bakterien darstellen. Wesener hat in den letzten Jahren die Möglichkeit einer sicheren Differentialdiagnose durch Färbungen zwischen beiten Arten bestritten, weil es keine qualitativen Differenzen zwischen ihnen giebt und die quantitativen Differenzen nicht absolut constant sind. Baumgarten hält die Differentialdiagnose wegen der quantitativen Unterschiede für möglich und ich muss ihm nach meinen Frfahrungen beistimmen.

In zweifelhaften Fällen müsste man die kurze Färbung in wässrigen Lösungen in der Kälte anwenden, weil sie besonders geeignet ist, die quantitativen Unterschiede hervortreten zu lassen. In mehr qualitativer Hinsicht dürfte das Verhalten zu Methylenblau als Färbungsmittel und zu unterchlorigsaurem Natron als Differenzirungsmittel in Frage kommen. Handelt es sich nur um die Darstellung ohne Rücksicht auf Differentialdiagnose, so empfehle ich

---

[1]) Die Syphilisbacillen 1885, S. 6.

für beide Bakterienarten die Färbung in Karbolfuchsin als die schnellste und sicherste.

Zum Nachweise der bei **Syphilis** in Geschwülsten und Sekreten gefundenen **Bacillen** benützt Lustgarten die oxydirende Wirkung von Kaliumpermanganat mit nachfolgender Einwirkung der reducirenden Eigenschaften der schwefligen Säure. Die mit Anilinwasser-Gentianaviolett 24 Stunden gefärbten Deckglaspräparate werden mit Wasser (nicht mit Alkohol) abgespült, kommen dann 10 Secunden in eine $1^1/_2$% Lösung von Kaliumpermanganat. Es bildet sich ein flockiger brauner Niederschlag von Manganhyperoxyd. Dann lässt man eine wässrige Lösung von reiner schwefliger Säure (aus metallischem Kupfer und Schwefelsäure gewonnen) einwirken. Das braune Manganhyperoxyd wird von der schwefligen Säure je nach der Concentration fast momentan oder in wenigen Secunden zu Manganoxydul reducirt; die hierbei gleichzeitig entstehende Schwefelsäure verbindet sich mit diesem Manganoxydul zu dem farblosen schwefelsauren Mangan. Es tritt Entfärbung ein. Ist dieselbe noch nicht genügend, so wird das Präparat mit Wasser abgespült, und dann die Einwirkung von übermangansaurem Kali und schwefliger Säure ein oder mehreremal wiederholt, aber nur 3 bis 4 Secunden lang, bis vollständige Entfärbung eingetreten ist. Eine Contrastfärbung ist nicht erreichbar und bei wenig Bacillen ist die Auffindung derselben trotz der blauen Farbe sehr schwer.

Die Differential-Diagnose gegen die bei demselben Vorgange sich ebenso verhaltenden, morphologisch ähnlichen Tuberkel- und Leprabacillen gründet sich darauf, dass die Syphilisbacillen durch Mineralsäuren rasch entfärbt werden. Statt der schwefligen Säure verwendeten Alvarez, Tavel und Matterstock Oxalsäure. De Giacomi[1] hat die Entfärbung durch Oxydation für den Nachweis dieser Bakterien sehr vereinfacht. Die Deckglaspräparate werden in Fuchsinlösung wenige Minuten erwärmt, dann in Wasser, dem einige Tropfen Eisenchloridlösung zugesetzt sind, abgespült, in concentrirter Lösung von Eisenchlorid entfärbt und dann gründlich mit Wasser abgespült; die Syphilisbacillen bleiben roth, alle anderen entfärben sich. Aehn-

---

[1]) Referat von Gottstein in: Fortschritte der Medicin 1885, No. 16.

lich wie Eisenchlorid wirkt nach Gottstein 5 % Kal. bichrom. und 2 % Argent. nitr.

Nach Doutrelepont und Schütz[1]) lassen sich die Syphilisbacillen auch in wässrigen Lösungen von Gentianaviolett färben.

Im Smegma praeputii wurden von Alvarez und Tavel[2]) Bacillen beobachtet, welche sich der Färbung gegenüber ähnlich verhielten und ähnliche Formen zeigten, wie die Syphilisbacillen von Lustgarten. Wird auch durch derartige Mittheilungen der differentialdiagnostische Werth der inzwischen bereits verbesserten und vereinfachten Lustgarten'schen Färbemethode modificirt, so werden doch durch diese Angaben allein die anderen Argumente von Lustgarten nicht berührt, nach denen es einstweilen wahrscheinlich bleibt, dass die Syphilis durch eine stäbchenförmige Bakterienart bedingt ist, da Lustgarten diese Bakterien nicht nur in Sekreten, sondern auch im Gewebe selbst und sogar in congenitalen Gummiknoten und zwar in charakteristischer Weise in Zellen eingeschlossen nachwies und Doutrelepont sie auch im Blute Syphilitischer fand.

Unabhängig von Alvarez und Tavel hatte auch Matterstock[3]) fast gleichzeitig gefunden, dass sich nicht nur in syphilitischen Geweben und Sekreten, sondern auch normal im Smegma praeputii sich färberisch derartig verhaltende Stäbchenbakterien finden, und Klemperer[4]) fand zur Färbung der Syphilis- und Smegmabacillen besonders eine Farblösung geeignet, welche aus gleichen Theilen concentrirtem Thymolwasser mit wässriger oder spirituöser Lösung von Fuchsin besteht. Karbolfuchsin leistet auch hier dieselben Dienste. Aehnlich wie bei Tuberkel- und Leprabacillen gelingt hier die Färbung in derselben Weise und es zeigen sich nur geringfügige quantitative Unterschiede. Ebenso scheint das Verhalten gegenüber den Entfärbungsmitteln zur maximalen Entfärbung nur quantitative Unterschiede zu bieten. Die Syphilisbacillen werden durch Säuren,

---

[1]) Deutsche med. Wochenschrift 1885, S. 320.

[2]) Archives de Physiologie 3. sér. VI 1885, No. 7.

[3]) Mittheilungen aus der med. Klinik d. Univ. Würzburg, Wiesbaden, Bergmann 1886.

[4]) Deutsche med. Wochenschrift 1885, S. 809.

Salpetersäure und noch besser Schwefelsäure, fast momentan entfärbt, die Smegmabacillen widerstehen einige Zeit. Umgekehrt widerstehen die Syphilisbacillen der Alkoholwirkung besser als die Smegmabacillen. Zur Differentialdiagnose gegenüber den Tnberkelbacillen ist zu bemerken, dass die Tuberkelbacillen nach der Säurewirkung auch nachträglicher Alkoholbehandlung widerstehen, während die Smegmabacillen nach erfolgter Säurewirkung, der sie Widerstand leisten, bei der darauf folgenden Alkoholbehandlung ganz entärbt werden. Daraus ergiebt sich folgendes Schema:

Nach erfolgter Färbung mit Karbol- oder Thymolfuchsin entfärbt Alkohol allein nur die Smegmabacillen, aber nicht die drei anderen Arten. Nach der Färbung entfärben Mineralsäuren sofort die Syphilisbacillen, etwas langsamer die Smegmabacillen und am langsamsten und erst nach längerer Zeit die Lepra- und Tuberkelbacillen. Nach erfolgter Färbung und kurzer Einwirkung der Mineralsäuren, also nach Ausschaltung der Syphilisbacillen, entfärbt Alkohol sofort die Smegmabacillen und es bleiben dann nur noch die Lepra- und Tuberkelbacillen gefärbt, welche in der früher angegebenen Weise auseinander zu halten sind.

Die Entscheidung ist manchmal auch bei grösster Uebung sehr schwer und es ist deshalb die Form der Bacillen sorgfältigst zu beachten unter besonderer Berücksichtigung dessen, dass die Smegmabacillen fast niemals ganz gleichförmig sind. Dies rührt daher, dass die Säurefestigkeit derselben ausschliesslich auf örtlich erworbenen Fetthüllen oder auf Fettdurchtränkung beruht und daher von den verschiedensten Bakterien, welche im Smegma praeputii saprophytisch existiren können, erworben werden kann. Dieser selbe Umstand ist bei den Bacillen, welche sich im Ohrsecrete, dem Ohrschmalz, finden, zu beachten, welche auf diese Weise eine Säurefestigkeit erwerben können, welche besonders zu Verwechslungen mit Tuberkelbacillen Veranlassung geben könnte.

Auch der Nachweis der Mikrokokken der Gonorrhoe und Blenorrhoe, der sog. Gonokokken, kann auf Schwierigkeiten stossen. Diese Bakterien sind besonders charakterisirt durch eine Anordnung zu zweien in Semmelform und durch ihren Einschluss in Eiterzellen. Das letztere ist aber auch bei anderen Eiterkokken der Fall, wie es

besonders C. Hess[1]) experimentell ermittelte. Bumm[2]) fand, dass die Gonokokken besonders auffallend sich in rundlichen Anhäufungen um die Kerne gruppiren, während die anderen Eiterkokken weniger regelmässig angeordnet sind. Der diagnostische Nachweis durch Färbung gründet sich darauf, dass die Gonokokken sich am besten mit violetten Pararosanilinen in Anilinwasser, Thymolwasser oder Karbolsäurewasser als Beize färben. Etwas schlechter färben sie sich in Fuchsin und am langsamsten in Methylenblau; nach Arning färbt das Methylenblau aber die Gonokokken in einem dunkleren blau als die Zellelemente. Die violett gefärbten Gonokokken werden bei der Gram'schen Methode entfärbt, wie bereits Bumm früher ermittelt hatte. Die gewöhnlichen Eiterkokken färben sich in den verschiedenen Farben viel gleichmässiger leicht und sie widerstehen bei der Gram'schen Methode, wie Gram früher gefunden hatte. Die Differentialdiagnose durch Färbung zwischen Gonokokken und gewöhnlichen Eiterkokken beruht demnach darauf, dass man, nach Färbung in Violett mit Beize, die Deckglastrockenpräparate nach Gram mit Jod-Jodkalium und dann mit Alkohol behandelt, wie auch besonders Roux[3]) hervorgehoben hat. Entfärben sich die in den Zellen um die Kerne gruppirten Semmelkokken, so sind es Gonokokken, bleiben die mehr gleichmässig kugligen und weniger charakteristisch in den Zellen angeordneten Kokken gefärbt, dann sind es gewöhnliche Eiterkokken. Nach Steinschneider[4]) kann man bisweilen Eiterkokken und Gonokokken nebeneinander derart färben, dass man nach der Gram'schen Behandlung, bei welcher die Eiterkokken dunkelblau zurückbleiben, mit wässrigem Vesuvin lange Zeit oder einem mit der 4 fachen Wassermenge verdünnten Löffler'schen Methylenblau nur 5 Sekunden nach färbt. Hierbei nahmen die Gonokokken die Contrastfarbe braun oder hellblau an.

Eine Doppelfärbung ist zu erzielen, wenn man nach der Violett-

---

[1]) Virchow's Archiv 1887, Bd. 110.

[2]) Der Mikroorganismus der gonorrhoischen Schleimhaut-Erkrankungen 1887, 2. Aufl., S. 57.

[3]) Comptes rendus 1886, Bd. 103, S. 899.

[4]) Berlin. klin. Wochenschrift 1890, No. 24.

oder Blaufärbung der Gonokokken das Protoplasma mit Eosinlösung vorsichtig roth nachfärbt.

Nach J. Schütz[1]) färbt man 8—10 Minuten in Karbol-Methylenblau, spült mit Wasser ab, taucht 3 Sekunden in Essigsäurewasser (5 gtt. Acid. acet. dil. in 20 ccm Wasser), spült gründlich mit Wasser ab. Nunmehr sind die Gonokokken isolirt gefärbt. Zur Contrast- und Grundfärbung lässt man eine verdünnte wässrige Safraninlösung kurz einwirken, bis eben diese Färbung kenntlich wird. Dann wieder Abspülen derselben in Wasser oder Troknen und Conserviren in Balsam. Die Gonokokken sind dunkelblau, Epithelien blau, Eiterzellen und Kerne lachsfarben.

Die Untersuchung des Blutes auf Bakterien

kann sehr grosse Schwierigkeiten bieten, weil schon im normalen Blute innerhalb der Gefässe und beim normalen Zerfalle des gesunden Blutes körnige Elemente vorhanden sind resp. sich bilden, die unter pathologischen Verhältnissen bei anämischen Zuständen, bei Fieber vermehrt auftreten, und welche leicht mit Kokken verwechselt werden können, schon sehr oft verwechselt sind und noch fast täglich damit verwechselt werden; z. B. die berühmten Syphiliskörperchen und die angeblichen Organismen des Schlangengiftes; hierher gehört auch Manches, was als Genese von Bakterien aus Stickstoffsplittern, aus Mikrozymen oder durch „Anamorphose des Protoplasma“ oder als Heterogenese angesprochen worden ist. Ein genaues Studium dieser Blut-Granulationen ist deshalb bei der Bakterienforschung ein unumgängliches Desiderat. Diese Granulationen bilden aber ferner einen Bestandtheil der zelligen Elemente des Blutes, welche wieder dadurch für die Aetiologie von Interesse sind, dass es Parasiten giebt, welche den amoeboiden Zellen ähnlich sind, z. B. die von Lewis im Blute von Ratten, von Koch im Blute von Hamstern, von Lankaster und Danilewski im Blute von Fröschen gefundenen pathogenetischen Geisselmonaden. Auch bei der Malaria sind nach der Entdeckung von Laveran, und ihrer Bestätigung durch Marchiafava und Celli und andere Forscher derartige Organismen betheiligt.

[1]) Münchener med. Wochenschrift 1889. No. 14.

Die direct oder durch ihre Granulationen zu Verwechslungen Veranlassung gebenden Elemente des Blutes, mit Ausnahme der rothen Blutkörperchen und ihrer Zerfallsproducte, theilt man nach Ehrlich[1]) ein:

I. Lymphogene Elemente:
   a) kleine Lymphocyten,
   b) grosse Lymphocyten.

II. Myelogene Elemente:
   eosinophile Zellen.

III. Unbestimmt (Milz und (oder) Knochenmark):
   a) grosse mononucleäre Zellen,
   b) Uebergangsformen,
   c) Polynucleäre.

Die kleinen lymphogenen Elemente sind etwas kleiner als die rothen Blutkörperchen, besitzen einen sehr grossen und sehr gut färbbaren Kern, so dass von Protoplasma nur sehr wenig oder nichts zu sehen ist. Die grossen Lymphocyten sind eine weitere Entwickelung der ersteren und von ihnen dadurch unterschieden, dass sie etwa 2—3 mal so gross als rothe Blutkörperchen sind und um den grossen, etwas weniger gut färbbaren Kern einen deutlichen Protoplasmasaum besitzen. Die myelogenen, eosinophilen Elemente sind grosse, rundliche Zellen mit einem grossen länglichen Kerne. Die grossen mononucleären Zellen sind ungefähr dreimal so gross als die rothen Blutkörperchen und besitzen einen grossen runden oder ovoiden Kern und grossen Protoplasmahof. Die mononucleären Uebergangsformen sind von diesen Zellen nur dadurch unterschieden, dass der Kern nicht mehr rund oder ovoid ist, sondern eine Einbuchtung erlitten hat. Die polynucleären Elemente sind etwas kleiner, aber immer noch grösser als die rothen Blutkörperchen und ihr Kern zeigt eine weitere Differenzirung, eine polymorphe Gestalt; sie bilden die Mehrzahl der weissen Blutkörperchen.

---

[1]) cfr. die S. 64 citirten Arbeiten von Ehrlich, Westphal, Schwarze; ferner Spilling: Ueber Blutuntersuchungen bei Leukämie. Dissert. Berlin 1880, und Einhorn: Ueber das Verhalten der Lymphocyten zu den weissen Blutkörperchen. Dissert. Berlin 1884.

Die körnigen Elemente oder Granulationen, welche in diesen Zellen vorhanden sind und beim Zerfalle derselben frei werden können, theilt man in Bezug auf ihr Verhalten zu den Anilinfarben ein:

Die α-Granulation oder eosinophile Körnung ist grobkuglig, stark glänzend und in allen sauren Anilinfarben tingibel. Sie findet sich in den myelogenen Elementen, ist im normalen Blute selten, bei leukämischen Prozessen stark vermehrt.

Die β-Granulation oder amphophile Körnung findet sich besonders im Knochenmark, im Blute vielfach in Leukocyten bei Kaninchen und Meerschweinchen und ist in saueren und basischen Anilinfarben tingibel.

Die γ-Granulation oder basophile Mastzellenkörnung ist, wie die Bakterien, durch basische Anilinfarben tingibel. Die Körner sind grob, wenig lichtbrechend, fehlen im menschlichen Blute normal fast ganz, treten bei leukämischen Prozessen vermehrt auf; im Blute einiger Thiere, besonders der weissen Ratten, sind sie normal vorhanden.

Die δ-Granulation oder basophile Körnung ist fein, in basischen Anilinfarben tingibel und findet sich als Bestandtheil der grossen mononucleären Elemente.

Die ε-Granulation oder neutrophile Körnung ist sehr fein, und erfüllt die polynucleären Elemente des Menschenblutes ganz dicht, kommt in den Uebergangsformen spärlich vor, und sehr selten in den mononucleären Elementen; sie ist in neutralen Farben tingibel.

Bei Ausserachtlassung der Färbung können diese Granulationen sämmtlich, und ebenso die Zerfallproducte der rothen Blutkörperchen, mit Kokken verwechselt werden. Bei systematischer Anwendung der Anilinfarben kann man sofort ausschliessen die α-, β- und ε-Granulationen. Eine Verwechselung ist dann nur noch möglich mit den γ- und δ-Granulationen, weil diese sich, wie die Bakterien, in basischen Anilinfarben färben. Diese letzteren sind durch ihr feines Korn relativ leicht von Kokken zu unterscheiden, und sind bis jetzt, wie es scheint, noch nicht mit Bakterien verwechselt worden. Die Mastzellenkörner dagegen kommen in ihren mittleren Grössen den bekannteren Formen der Kokken so nahe, dass nicht nur die einzelnen freien Granulationen im Blut als Kokken gedeutet worden sind,

sondern sogar die sogenannten Mastzellen in den Geweben als Kolonien von Kokken wiederholt beschrieben wurden. Rein morphologisch sind sie oft dadurch zu unterscheiden, dass sie das gleichmässige Aussehen der Kokken nicht alle haben, sondern dass sich die verschiedensten Uebergänge zwischen den verschieden grossen Körnern finden.

Will man das Blut auf Bakterien zur Orientirung prüfen, so streicht man ein Tröpfchen flach aus, trocknet die dünne Schicht an, fixirt, indem man dieselbe dreimal durch die Flamme zieht, und färbt wie gewöhnlich. In derartigen Präparaten färben sich die Bakterien genügend, die Granulationen aber in der Regel noch nicht gut.

Die Entnahme eines höchstens stecknadelkopfgrossen Bluttropfens muss zu diesem Zwecke mit grösster Vorsicht geschehen. Man entnimmt entweder bei Gelegenheit einer Blutung mit einer geglühten und wieder abgekühlten Platinnadel ein Tröpfchen Blut oder durch Einstich in die Haut (am besten an der Fingerkuppe) mit einer durch vorangegangenes Glühen sterilisirten Nadel. Die Haut wird nach ev. vorausgegangenem Rasiren, an dieser Stelle mit Seife und Bürste gereinigt, dann mit 1 p. M. Sublimat gewaschen, das Sublimat mit Alkohol entfernt und der Alkohol mit Aether aufgenommen, den man verdunsten lässt. Der erste hervorquellende Blutstropfen wird mit geglühter Platinnadel weggenommen und erst die folgenden Tropfen werden benutzt. Auf ein hervorquellendes Bluttröpfchen wird ein mit einer Pinzette gefasstes Deckglas leicht aufgetupft, aber ohne jede Berührung mit der umgebenden Haut. Auf dieses mit der Pinzette gehaltene und mit dem Blutstropfen versehene Deckglas wird mit einer Pinzette ein zweites Deckglas gelegt, welches durch seinen Druck das Bluttröpfchen zu einer ganz flachen Schicht ausbreitet, in der die Elemente sich nicht wesentlich alterirt zeigen. Die beiden mit Pinzetten gefassten Deckgläschen werden von einander abgezogen, so dass man gleich zwei Deckgläser mit den gewünschten dünnen Schichten Blut erhält. Nach Nikiforoff[1]) berührt man

---

[1]) Wratsch. 1887, S. 183. Referat in Zeitschrift f. wissenschaftl. Mikroskopie 1888, Bd. V, S. 107.

mit einem Deckglase die Kuppe eines Bluttropfens und fährt dann mit dem Rande eines zweiten Deckglases, welches zum ersten unter einem Winkel von 45° gehalten wird, über das erste. Hierdurch wird das Blut auf dem ersten Deckglase in einer ganz dünnen Schicht ausgebreitet und die Präparate werden besser als beim Auseinanderziehen von zwei Deckgläsern.

Die Deckgläschen werden sofort getrocknet und, nachdem die Schicht lufttrocken geworden ist, sofort zum Theil wie oben angegeben, nur nach kurzem Erhitzen auf Bakterien geprüft, zum Theil aber eine bis mehrere Stunden einer Temperatur von 120° ausgesetzt und dann erst zur Prüfung auf die Granulationen gefärbt. Nach Nikiforoff erreicht man das Ziel ebenso gut, wenn man das lufttrockene Präparat, statt es zu erhitzen, 2 Stunden in eine Mischung von gleichen Theilen Alkohol und Aether legt, dann abtrocknet und färbt. Will man die Blutelemente nur morphologisch, ohne besondere Rücksicht auf Bakterien, Granulationen oder eingeschlossene Mikroparasiten untersuchen, so kann man die Entnahme derart vornehmen, dass man nach Eberth und Schimmelbusch auf die gereinigte Haut einen grossen Tropfen 1% Osmiumsäure bringt und durch diesen hindurch die Haut ansticht. Das Blut vertheilt sich dann, ohne mit der Luft in Berührung gekommen zu sein, in der Osmiumsäure und ist zur frischen Untersuchung der unverändert bleibenden Elemente geeignet.

Zur Darstellung der eosinophilen Elemente allein dient eine 0,5% Lösung von Eosin. Zur gleichzeitigen Darstellung der verschiedenen Zellen und Granulationen des Blutes dient folgende Mischung:[1]) 100 ccm Wasser, 100 ccm Glycerin, 100 ccm absoluter Alkohol, Hämatoxylin 2 gr, Alaun bis zur Sättigung, Eosin 1 gr, Eisessig 10 ccm. Nach eingetretener Färbung erfolgt Abwaschen in Wasser und Beobachten in demselben oder nach dem Abwaschen Trocknen und Einschluss in Balsam. Die rothen Blutkörperchen zeigen eine intensiv rothe Farbe, die Kerne der Lymphocyten und Polynucleären sind intensiv blau, die Kerne der Mononucleären bläulichgrau gefärbt. Das Protoplasma der grossen Lymphocyten und der Polynucleären

---

[1]) Ehrlich: Deutsche med. Wochenschrift 1883, No. 46.

ist röthlich, das der Mononucleären dunkelgrau. Sehr brauchbar ist auch eine Mischung eines gelben, schwarzen und rothen Farbstoffs: ein Volumen eines mit Aurantia gesättigten Glycerin wird mit zwei Volumen Glycerin versetzt, dann Anilinschwarz (Indulinsulfosäure) und Eosin in Ueberschuss zugesetzt und durch langes Schütteln gesättigt. Diese gesättigte, glycerinige Lösung färbt alle hämoglobinhaltigen Parthien intensiv orange, die Kerne blau bis grauschwarz und selbst schwarz, die eosinophile Körnung roth bis rothschwarz.

Zur Darstellung der neutrophilen Körnung dienen neutrale Farben, welche durch Zusammentreffen von Farbbasen mit Farbsäuren entstehen, z. B. wenn Säurefuchsin und Orange (G) mit dem basischen Methylgrün gemischt werden. Man mengt nach Ehrlich 125 ccm einer gesättigten wässrigen Orangelösung mit 125 ccm einer in 20 %igem Alkohol gesättigten Lösung von Säurefuchsin, fügt 75 ccm absoluten Alkohol hinzu und dann allmählich unter Schütteln 125 ccm gesättigte wässrige Lösung von Methylgrün. Die Lösung bleibt einige Zeit stehen, es bildet sich dann sowohl ein Niederschlag, als ein Häutchen an der Oberfläche. Man führt, um die Lösung ganz klar zu erhalten, eine Pipette in die Mitte der Lösung, entnimmt hier beliebige niederschlagsfreie Mengen; Pipette sowohl als Gefässe müssen absolut trocken sein, weil sonst sofort wieder Trübungen auftreten. In dieser Mischung färbt sich das Hämoglobin gelb bis orange, die Kerne grünlich, die neutrophile Körnung violett, die eosinophile dunkelgrau mit einem Stich in's Blaue.

Die Färbung der besophilen Granulationen erfolgt wie die der Bakterien durch basiche Anilinfarben.

Die Wichtigkeit dieser Untersuchungsmethoden für den Nachweis von Mikroorganismen im Blute ist von Koch[1]) schon früher dargelegt worden, hat aber die nöthige Beachtung noch nicht überall gefunden. Die seit der 1. Auflage hier gegebene Darstellung war deshalb durchaus erforderlich und um so nöthiger, als in Folge der schweren Zugänglichkeit der Original-Arbeiten selbst unsere guten Handbücher der histologischen Technik hierüber bis jetzt ungenügend berichten.

---

[1]) Mittheilungen, Bd. I, 1881, S. 7.

Bei Verdacht auf Mikroparasiten muss man das Blut auch ungefärbt im hängenden Tropfen frisch untersuchen, weil einige Bakterien, z. B. die Recurrensspirochaeten, in Folge ihrer charakteristischen Form und Bewegung sich dabei sofort zu erkennen geben.

Der **Gewebssaft** muss durch Ausstreichen mit einem Skalpell oder einer Platinnadel oder durch Auftupfen mit dem Deckglase auf dem letzteren in dünner Schicht ausgebreitet werden. Dies geschieht gerade so wie bei den Blutpräparaten. Im Blute können ausgetretene Protaplasmakörner zu Verwechslungen mit Kokken, sich ausscheidendes Fibrin zur Verwechslung mit Stäbchen und Fadenbakterien führen. In den Gewebssaftpräparaten ist eine Irrthumsmöglichkeit dadurch gegeben, dass die Zellkerne schon bei einigem Drucke ausgestrichen werden. Es entstehen dadurch Stäbchen- und Fadenformen, welche an Bacillen und besonders oft an die sogen. Köpfchenbakterien der früheren Autoren erinnern und die früher zu manchen unrichtigen Angaben führten.

Zur Vermeidung solcher Irrthümer und zum besseren Auffinden von Bakterien im Blute und Gewebe hat Günther[1]) folgendes Verfahren angegeben: Die fertigen Deckglastrockenpräparate werden etwa 10 Secunden mit 1 bis 5 % Essigsäure behandelt. Hierdurch wird das Hämoglobin aus den Blutscheiben ausgezogen und überhaupt werden die protoplasmatischen Bestandtheile gelockert, so dass sie abgespült werden können. Das Abspülen muss gründlich geschehen, damit keine Säure zurückbleibt, event. muss mit einer Spur Ammoniak neutralisirt werden, welche dann aber wieder abzuspülen ist. Hierauf werden die Präparate nochmals getrocknet. In derartig behandelten Präparaten färben sich die Bakterien fast isolirt. Ist die Schicht sehr stark oder fest, so kann man die Lockerung des Protoplasma statt mit Essigsäure mit 2 bis 3 % wässriger Pepsinlösung bewirken.

Spina[2]) behandelte Deckglastrockenpräparate mit Tanninlösung 1 : 2; die so behandelten Präparate widerstanden nach Färbung mit

[1]) Fortschritte der Medicin 1885, Bd. III, S. 23; Deutsche med. Wochenschrift 1887, No. 22.

[2]) Allgem. Wiener med. Zeitung 1887, No. 15.

Violett plus Beize den Mineralsäuren ähnlich wie Tuberkelbacillen. Dieses Verfahren dürfte sich vielleicht für das Färben solcher Bakterienarten empfehlen, welche dem Entfärben wenig widerstehen.

Nachweis und Färbung der Geisseln, Fig. 1 (7, 9, 14, 16) S. 23. Dieselben machen sich im hängenden Tropfen durch einen Strudel an einem oder beiden Polen der Bakterien bemerkbar. Ungefärbt sind dieselben direct schwer zu beobachten. Nach Koch[1]) und Dowdeswell[2]) gelingt es jedoch bei Einbettung in Lösung von Kaliumacetat (S. 112) statt in Balsam. An Deckglas-Trockenpräparaten gelingt nach Koch (l. c. S. 419) eine Färbung durch Zusatz von concentrirten wässrigen Lösungen von Extr. campech; die Geisseln werden braun gefärbt, doch ist die Färbung in dieser Weise nicht haltbar. Man legt deshalb die gefärbten Präparate einige Zeit in 0,5 $^0/_0$ige Chromsäure oder in Müller'sche Lösung, es bildet sich dann eine unlösliche, braunschwarze Verbindung des Extr. campech. mit der Chromsäure. Nach dem Abspülen können diese Präparate direct in Glycerin, oder nach vorausgegangenem Trocknen in Canadabalsam conservirt werden. Nach Neuhauss[3]) erreicht man eine intensive Schwarzfärbung von Bakterien (Membran) und Geisseln, wenn man die Deckglaspräparate 5 Minuten auf schwarzer sog. Kaiser-Tinte kocht, sie dann 15 Minuten in schwacher, erwärmter Lösung von neutralem chromsaurem Natron einlegt und den ganzen Vorgang 2 bis 3 Mal wiederholt.

Künstler[4]) giebt zur Darstellung der Geisseln von Spirillum tenue folgendes Verfahren an. Man bringt ein Tröpfchen spirillenhaltige Flüssigkeit auf den Objectträger, fügt einen Tropfen Osmiumsäure zu und überlässt das Gemisch 15 Minuten der Verdunstung. Den so fixirten Tropfen bedeckt man mit einem Deckgläschen und bringt auf die Mitte der 4 Seiten desselben je ein kleines Tröpfchen concentrirter Lösung von Collin-Schwarz, welches mittelst einer Nadel mit der Flüssigkeit unter dem Deckglase in Verbindung gesetzt

---

[1]) Cohn's Beiträge zur Biologie der Pflanzen, 1877. II. 3. Heft.
[2]) Annales de Micrographie 1890, II, S. 377.
[3]) Centralblatt f. Bakteriologie 1889, V, No. 3.
[4]) Comptes rendus 1887, Bd. 105, S. 684.

wird. Darauf umgiebt man das Deckglas mit Paraffin und darauf mit Wachs, um jede weitere Verdunstung zu verhüten. In ca. 8 bis 14 Tagen sind die Cilien sehr deutlich gefärbt.

Derartige Färbungen machen es wahrscheinlich, dass diese geisselartigen Gebilde morphologisch nicht genau dem entsprechen, was man bei anderen Mikroorganismen als Geisseln auffasst, bei denen dieselben Protoplasmafortsätze sind. Van Tieghem[1]) fand ausserdem, dass diese geisselartigen Gebilde bei Clostridium butyricum mit Kupferoxydammoniak Cellulosereaction zeigen und fasste dieselben nur als Anhänge oder Fortsätze der Membran auf; andere Geisseln ergeben jedoch wie die Membran keine Cellulosereaction.

Wenn auch die Beweglichkeit der Bakterien an sich nicht die Existenz von Geisseln voraussetzt, so ermittelte doch Zopf,[2]) dass es bei einigen der höheren pleomorphen Arten auch ächte, protoplasmatische Geisseln giebt.

Waddington[3]) fand bei Infusorien tropfweisen Tanninzusatz zur Darstellung der Cilien geeignet. Die Concentration muss so gewählt werden, dass sie die Thiere nicht gleich tödtet; im Allgemeinen war 1 Tannin zu 4 Glycerin eine brauchbare Lösung.

Als fast ebenso gutes Reagens auf Cilien empfiehlt Waddington den spurenweisen Zusatz wässriger oder alkoholischer Lösungen von schwefliger Säure.

Der Nachweis der Geisseln ist neuerdings ganz wesentlich gefördert worden durch Löffler[4]) und Trenkmann.[5]) Der letztere Autor beobachtete (im Gegensatz allerdings zu einigen darüber gemachten Angaben von Löffler), dass sich die sonst so schwer färbbaren Geisseln, ähnlich wie die Endosporen, ohne Beize in mässigem Grade mit violetten basischen Anilinfarben färben, wenn sie auf 210° erhitzt werden, was auf jeden Fall gründlich gegen ihre Protoplasmanatur sprechen würde. Die Einführung der Beizen

[1]) Bulletin de la Société Botanique de France 1879, T. 26, S. 37.
[2]) Zur Morphologie der Spaltpflanzen 1882, S. 7.
[3]) Journal of Microsc. Soc. 1883. Ser. II, vol. III.
[4]) Centralblatt für Bakteriologie 1889, VI, No. 8; 1890, VII, No. 20.
[5]) ibid. 1889, VI, No. 16; 1890, VIII, No. 13.

ermöglichte es zuerst Löffler und unabhängig von ihm auch Trenkmann, die Geisseln sicher zu färben. Die ausgezeichnete Methode von Löffler beruht auf der Beobachtung, dass sich die basischen Anilinfarben in Tanninlösungen lösen und dass dieselben mit den Eisensalzen der Beize, des Tannins, Farblacke bilden, auf deren Bildung eben die Färbung der gebeizten Organismen beruht.

Zur Färbung müssen die Bakterien gut isolirt und besonders frei von eiweissartigen Bestandtheilen des Nährbodens sein. Löffler empfiehlt besonders junge, 5—8 Stunden alte Kulturen von Blutserumflächen und Suspension in gewöhnlichem Wasser, statt in destillirtem Wasser, welches auf die Beweglichkeit vieler Bakterien schädigend wirkt.

Als Beize dient eine Mischung von 10 ccm Tanninlösung (20 : 80 Wasser), 5 ccm kalt gesättigte Ferrosulfatlösung und 1 ccm wässriger oder alkoholischer Fuchsin-, Methylviolett- oder Wollschwarzlösung; am meisten zu empfehlen ist die Fuchsintinte, weil sie sich besonders auch zum Photographiren eignet. Diese Beize nun ist für manche Bakterien (z. B. Spirillum concentricum) gerade richtig. Manche Bakterien verlangen jedoch einen Zusatz von Alkali oder Säure. Eine genaue Begründung dieses Postulates ist noch nicht möglich; Löffler liess sich von der Feststellung Petruschky's (cfr. später Milchserum als Nährboden) leiten, dass manche Bakterien in Molke verschiedene Grade von Säure, andere trotz der Anwesenheit des Milchzuckers Alkali bildeten, und stellte fest, dass die Alkalibildner Säure, die Säurebildner Alkalizusatz zur Beize erfordern. In dieser Weise ermittelte er, dass von einer 1 % Lösung von Natriumhydratlösung (1/4 Normallösung) zugesetzt werden mussten zu obigen 16 ccm Beize 4 Tropfen für den weissen Kartoffelbacillus, 12 Tr. für B. crystallosus, 20 Tr. für M. agilis, 22 Tr. = 1 ccm Lösung für Typhusbacillen, 28—30 Tr. für B. subtilis, 36 Tr. für B. des malignen Oedems und Rauschbrandes. Von einer auf diese Natronlösung gestellten Schwefelsäurelösung erforderten 1/2—1 Tropfen die Cholerabakterien, 3—4 Tr. Vibrio Metschnikoffi, 5—6 Tr. B. pyocyaneus, 9 Tr. das Spirillum rubrum, 10 Tr. B. der blauen Milch.

Das Deckglas muss sorgfältig gereinigt sein und das Material gut eingebrannt werden unter Vermeidung jeder Ueberhitzung. Das noch warme Deckglas wird mit einem Tropfen Beize beschickt und über der Flamme bis zur Blasenbildung erwärmt, aber ein zu starkes Kochen sorgfältig vermieden, damit die Beize dem Deckglase nicht fest anhaften bleibt. Unter leichtem Hin- und Herbewegen lässt man die erwärmte Beize $^1/_2$ bis 1 Minute mit dem Deckglase in Berührung. Darauf wird mit einem kräftigen Strahle destillirten Wassers abgespült und darauf zur Entfernung aller Reste der Beize, welche mit der Farblösung Niederschläge geben würden, in absolutem Alkohol abgespült, bis das Deckglas ganz klar erscheint und nur die Stellen, an welchen die bakterienhaltigen Wassertröpfchen eingebrannt sind, gebeizt erscheinen.

Zur Herstellung der Farblösung werden 100 ccm Anilinwasser mit festem Fuchsin (ca. 5 gr) versetzt und unter Umschütteln soviel gelöst, wie möglich, und filtrirt. Zu dieser klaren Anilinwasser-Fuchsinlösung wird soviel 1 p. M. Natronlösung hinzugefügt, dass die klare durchsichtige Lösung eben undurchsichtig zu werden beginnt (Schwebefällung). Von dieser Farblösung wird jedesmal soviel frisch auf das Deckglas filtrirt, dass dasselbe ganz von Farblösung bedeckt ist; darauf wird es eine Minute in der Flamme bis zur Dampfbildung erwärmt und dann die Farblösung abgespült.

Da derartige Färbungen mehr oder weniger sicher nicht als ächte Protoplasma-, sondern als Membranfärbungen anzusprechen sind, da auch andere, modificirte Protoplasmaderivate, z. B. die Flimmerhaare der Epithelien, die Schwänze der Spermatozoen dieselben Färbungen annehmen, so bleibt über die ächte Ciliennatur dieser Gebilde noch mancher Zweifel. Die oben angeführte Beobachtung von Zopf, die Angabe von Trenkmann, dass bei Spirillum undula der contrahirte Inhalt mit der Geissel nachweisbar zusammen hing, machen es nicht unwahrscheinlich, wie es Löffler für eine Species von Infusorien aussprach, dass die bisher als Cilien und Wimperhaare angesprochenen Gebilde überhaupt eine Art Scheide, also Fortsetzung der Membran, darstellen, aus welcher feinere, wirklich protoplasmatische, also ächte Geisseln hervorragen resp. hervorgestrekt werden. Diese Erklärung würde alle Widersprüche, die bisher bestehen, lösen.

Nachweis und Färbung der Sporen und der Chromatinkörner. Taf. II. Fig. 10.

Beobachtet und gezeichnet und zum Theil schon richtig als Sporen erkannt, wurden endogene Sporen von Bakterien zuerst wohl von Perty.[1]) Pasteur[2]) machte dann 1865 bis 1870 einen scharfen Unterschied zwischen der Biologie der Organismen und ihrer Keime und fasste die Bildung der in den Vibrionen beobachteten kernähnlichen, stärker lichtbrechenden Körperchen als eine Art Parthenogenesis auf. Die Bildung von sporenähnlichen Gebilden hat demnach Pasteur zweifellos unabhängig wieder gefunden, da die ältere Untersuchung von Perty in Vergessenheit gerathen war. Auch den physiologisch wichtigsten Punkt, dass diese Gebilde einen Dauerzustand darstellen, hat Pasteur experimentell sicher gestellt; das morphologisch Entscheidende für die Sporennatur, das Auskeimen dagegen war ihm noch entgangen. Der erste, welcher nicht nur die Bildung, sondern auch die Auskeimung der Sporen richtig erkannte, war Cohn.[3]) Weitere Einzelheiten brachten Koch, Brefeld, Buchner und besonders Prazmowsky,[4]) welcher verschiedene Arten der Sporenauskeimung, Fig. 1 (18 und 19), sicher stellte, wodurch dieser Fructificationsvorgang eine erhöhte Bedeutung gewinnt. Einen neuen Typus der Endosporen-Bildung ermittelte Klein.

Die Beobachtung der endogenen Sporen erfolgte anfangs ausschliesslich im ungefärbten Zustande; Fig. 1 (5 b, 8, 9, 10, 12) S. 23. Sie erscheinen besonders schön im hängenden Tropfen und bei Abblendung als starkglänzende rundliche, ovale, kurzstäbchenförmige oder bohnenförmige Körperchen in den weniger glänzenden Bakterien oder frei neben denselben. Bald liegen sie mehr nach der Mitte zu,

---

[1]) Zur Kenntniss kleinster Lebensformen 1852, Taf. XV, Fig. 26 und folgende und S. 181 über Sporonema.

[2]) Études sur la maladie des vers à soie, 1870, I, S. 168, 228, 256.

[3]) Beiträge zur Biologie der Pflanzen 1876, II. Bd., 2. Heft, S. 263.

[4]) Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bakterien-Arten 1880 und Ueber den genetischen Zusammenhang der Milzbrand- und Heubakterien. Biolog. Centralblatt 1884, No. 13.

bald ganz am Ende; die Zellen, in denen sie sich bilden, sind bald unverändert, bald eigenthümlich aufgetrieben. Da contrahirtes Bakterienprotoplasma nach Prazmowsky gleichfalls stärker lichtbrechend ist, so ist das Gesammtverhalten in Betracht zu ziehen, um ein stärker lichtbrechendes Körperchen als Spore zu erklären.

Hierher gehörte früher allein das obige, regelmässig unter bestimmten biologischen Umständen eintretende morphologische Verhalten, die Resistenz gegen chemische Eingriffe, gegen hohe Temperaturen und gegen das Austrocknen und die Beobachtung, dass sich bei der Anwendung wässriger oder verdünnter alkoholischer Lösungen die Sporen nicht färben und als ungefärbte glänzende Lücken in den gefärbten Bakterien erscheinen.

Uebrigens treten bisweilen glänzende Körperchen im Innern der Bakterien auf, welche sich unter denselben Bedingungen gleichfalls nicht färben und doch sicher gar nichts mit den endogenen Sporen zu thun haben. Einzelne derselben färben sich nach Marchand[1]) mit Jod intensiv gelb, während das Bakterienprotoplasma nur schwach gelblich wird und die Sporen ganz ungefärbt bleiben. Auch vacuolenartige Lücken und Fetttröpfchen können event., weil sie keine Farbe aufnehmen, zur Verwechslung mit endogenen Sporen Veranlassung geben.

Eine zufällige Beobachtung lehrte aber die Sporen auch gefärbt zur Anschauung zu bringen. Koch[2]) sah, dass sich bei Färbung der Tuberkelbacillen mit Anilinwasser-Methylviolett resp. mit alkalischem Methylenblau die Sporen einer grossen Bacillenart gleichfalls blau färbten, so dass sie grossen Kokken sehr ähnlich waren, während sich die Bacillen selbst bei der Nachbehandlung braun färbten. Die Sporen anderer Bacillen vermochte Gaffky nicht in dieser Weise zu färben. Dagegen gelang es Neisser, die Sporen roth, die Bacillen blau zu färben, wenn er Anilinwasser-Fuchsin warm anwandte und mit Methylenblau nachfärbte, und Bienstock[3]) machte von

[1]) Sitzungsbericht der Gesellschaft zur Beförderung der gesammten Naturwissenschaften zu Marburg 1885. S. 20.

[2]) Mittheilungen 1884, Bd. II, Tafel V, Fig. 23 und S. 34.

[3]) Zeitschrift für klin. Med. 1884, S. 1.

dieser Färbung ausgedehnten Gebrauch. Weiter ermittelte Buchner[1]) ein Verfahren zur isolirten Färbung der Sporen. Weil die Färbung der lebenden Bakterien damals nicht gelang, wohl aber der durch Trocknen und Erhitzen getödteten, glaubte Buchner den Grund der Nichtfärbung der Sporen in der grösseren Resistenz der Sporenmembran suchen zu müssen. Er suchte deshalb die Sporenmembran von bac. subtilis zu tödten und dadurch für Farben zugänglich zu machen, und erreichte dies, indem er die Deckglas-Trockenpräparate $^1/_2$ bis 1 Stunde auf 210° im Trockenschrank erhitzte oder 1 Stunde bei 120° im Dampfkessel hielt, oder indem er das Präparat mit concentrirter englischer Schwefelsäure betupfte und nach 25 Secunden sorgfältig auswusch, oder endlich, indem er concentrirte Kalilauge längere Zeit einwirken liess. In den so behandelten Präparaten färben sich, besonders durch Methylenblau, die Sporen allein, während die Bakterien selbst keine Farbe mehr annahmen.

Mir gelang es gleichzeitig und unabhängig von Buchner's und Neisser's Versuchen sowohl die isolirte als die Doppelfärbung der endogenen Sporen (cfr. erste Auflage dieses Werkes.)

Untersucht man kurz vor der Sporenbildung im hängenden Tropfen, so findet man in vielen Bakterien schon glänzende Körperchen, welche aber nicht die Gleichmässigkeit der Sporen haben. Färbt man die getrockneten und durch dreimaliges Durchziehen durch die Flamme fixirten Präparate mit wässrigen oder verdünnten alkoholischen Farblösungen, so findet man in diesem Stadium die Bakterien nicht so gleichmässig gefärbt wie sonst, sondern einzelne Parthien stärker und mehr körnig gefärbt. Dieses contrahirte Protoplasma färbt sich besser als das nicht verdichtete Bakterien-Protoplasma. Die ersten Beobachtungen hierüber hatte ich zuerst 1883 bei den Involutionsformen des Bac. cyanogenus gemacht. Dann folgt ein Stadium, in dem die glänzenden Körperchen schon viel gleichmässiger sind, aber sich noch sehr gut färben, und dann folgt ein Stadium, in welchem sich gleichmässige, glänzende Körperchen in den ungefärbten Prä-

---

[1]) Ueber das Verhalten der Spaltpilz-Sporen zu den Anilinfarben. Aerztliches Intelligenzblatt 1884, No. 33, S. 370.

paraten finden, welche aber keine Farbe mehr annehmen. Erst jetzt ist die Spore fertig durch Bildung einer schwer durchgängigen Membran, welche die Aufnahme des Farbstoffs bei der gewöhnlichen Art der Einwirkung verhindert.

Zieht man das lufttrockene Deckglaspräparat dreimal durch die Flamme, so färben sich in diesen Präparaten Bakterien und Kerne gleich gut, zieht man öfter, bis zu etwa sechsmal durch die Flamme, so färben sich successive die Bakterien immer schlechter, die Kerne noch immer gut, aber auch das contrahirte, aber noch nicht zur ächten Spore gewordene Protoplasma der Bakterien färbt sich noch. Man kann dann neben den Kernen oft körnige Elemente sehen, über deren Zugehörigkeit zu den schlecht gefärbten Bakterien man sich leicht täuschen kann. Zieht man noch ofter, bis zu zehnmal, durch die Flamme, so verlieren auch die Kerne und das contrahirte Protoplasma die Fähigkeit, Farben aufzunehmen, dagegen gewinnen diese Fähigkeit die Sporen.

Bei einzelnen Fäulnissbacillen genügt schon 7 maliges Durchziehen, bei andern erst 10 maliges (im Trockenschrank war das gleiche Stadium bei ca. 180° resp. 200° in etwa $^1/_4$ bis $^1/_2$ Stunde erreicht). Die Sporen nehmen dann wässrige Lösungen von rothen, violetten, blauen, braunen und grünen basischen Anilinfarben an. Diese isolirten Färbungen sind zur Prüfung der Resistenz der Sporen, wie Buchner meinte, vielleicht mit zu benutzen. Da man hierbei aber über das Verhalten der Sporen zu den Bakterien nichts erfährt, ist es besser, Doppelfärbungen anzuwenden. Das Verfahren ist fast dasselbe, quantitativ gesteigerte, wie bei den Tuberkelbacillen. Man färbt entweder die dreimal durch die Flamme gezogenen Präparate mit der starken alkalischen Lösung, welche man 12 bis 24 Stunden einwirken lässt (weniger gut durch Erwärmen auf 1 Stunde abkürzen) und färbt mit Vesuvin nach, oder besser man benutzt die Anilinwasser-Farblösungen derart, dass man die getrockneten und erhitzten Deckglaspräparate auf heissen Lösungen von Anilinwasser-Fuchsin (Methylviolett) schwimmen lässt. Nach etwa 10 bis 20 bis 60 Minuten, nach den Arten etwas abwechselnd, sind die endogenen Sporen und das Protoplasma der Bakterien fast gleichmässig gut gefärbt. Man kann die Färbung auch im Dampf-

apparate vornehmen, in dem die Deckglaspräparate, in der Farblösung liegend, bis zu einer Stunde bleiben. Die Nachbehandlung wechselt nach den Arten. Bei manchen sich leicht färbenden Sporen z. B. von Bacillus Megatherium genügt es schon, wenn man nach Abspülen der überschüssigen Farbe zum Färben der Bacillen eine wässrige Lösung von Methylenblau (Vesuvin) einige Minuten einwirken lässt. Sicherer gelingt die Doppelfärbung in den meisten Fällen, wenn man nach Entfernung des überschüssigen Farbstoffes einige Secunden bis Minuten 90 % Alkohol einwirken lässt, dem eine Spur der Farbe zugesetzt ist, in der die erste Färbung gemacht wurde, und dann erst die zweite wässrige Farbe anwendet. Bisweilen muss man statt des Alkohols verdünnte Mineralsäure anwenden, um ganz scharfe Bilder zu erhalten. Wenn ich auch im Princip keinen Unterschied gefunden habe, ob ich Fuchsin oder Methylviolett zur Färbung der Sporen und Methylenblau oder Vesuvin zur Nachfärbung der Bakterien benutzte und mit kleinen Modificationen meist mit beiden Färbungen positive Resultate erhielt, so dürfte den Meisten doch die schon von Neisser verwendete Färbung mit Fuchsin und Nachfärbung mit Methylenblau ebenso wie bei den Tuberkelbacillen mehr zusagen. Tafel II, Fig. 10. Karbolsäure ist als Beize für Sporen nicht in allen Fällen so gut geeignet wie Anilinwasser.

Man findet neben ganz gleichmässig dunkelroth oder blau gefärbten Sporen auch solche, deren Membran stärker gefärbt ist, was darauf hinweist, dass die Membran der endogenen Sporen wohl da Bestimmende für diese maximale Entfärbung und die dadurch ermöglichte Doppelfärbung ist.

Einzelne endogene Sporen färben sich übrigens schon in gesättigten wässrigen und verdünnten alkoholischen Lösungen bei gleichzeitigem Erwärmen und zum Theil selbst in der Kälte. Die Differenzen unter den endogenen Sporen scheinen in Bezug auf die Färbbarkeit kaum geringer, als unter den Bakterien selbst.

Hauser[1]) färbte die Endosporen von Sarcina derart, dass er das fixirte und erhitzte Präparat mit einer verdünnten alkoholischen Fuchsinlösung bedeckte und dann dieses Präparat mit der Farblösung

[1]) Beiträge zur pathologischen Anatomie. Festschrift für Zenker 1887.

30 bis 40 Mal in die Flamme eines Bunsen-Brenners führte, wobei fortwährend Dämpfe aufstiegen; bei zu schnellem Verdampfen ist etwas Farbe nachzugeben. Darauf kommt das Präparat einige Secunden bis zu einer Minute in 25 % Schwefelsäure, dann wird es gründlich nachgespült und mit stark verdünnter Lösung von wässrigem Methylenblau nachgefärbt.

Die Arthrosporen färben sich, soweit dies bis jetzt bekannt ist, wie contrahirtes Bakterienprotoplasma meist schon in wässrigen Lösungen gut, da ihnen die gegen Chemikalien resistente Membran der endogenen Sporen fehlt. Eine Differentialdiagnose gegen andere morphologisch ähnliche Gebilde durch eine besondere Färbung resp. Doppelfärbung ist bis jetzt nicht sicher möglich.

Bei B. cyanogenus hatte ich schon 1882/83 Körner beobachtet, welche sich regelmässig einstellten und mit Methylenblau intensiver färbten als die Stäbchen. Finkler und Prior[1]) hatten 1884 in den „Polkörnern“ terminale, sich besser als der übrige Theil der Bakterien färbende Körner beobachtet. Dasselbe fand bald darauf auch Babes[2]) bei Versuchen lebende Cholerabacillen zu färben. Diese Körner schienen mit den Theilungsvorgängen in Verbindung zu stehen oder vielleicht Sporen oder Vorstufen derselben zu sein. In ausgedehnter Weise hatte v. Malapert[3]) ähnliche und anders gelagerte Körner in verschiedenen Bakterien gefunden und wegen der Regelmässigkeit ihres Auftretens als eine Art Sporenbildung aufgefasst. Dann beobachtete 1886 Schrön und Voltolini eigenthümliche Körner in den Tuberkelbacillen. Darauf machten Babes[4]), Ernst[5]), Neisser[6]) genaue Angaben über Doppelfärbungen solcher Körner, nach denen man besonders bei Färbung mit alkalischem Methylenblau rothe Körner in blau gefärbten Stäbchen (also durch

---

[1]) Ergänzungshefte zum Centralblatt für allgemeine Gesundheitspflege. 1885. I.

[2]) Progrès médical 6. Dec. 1884.

[3]) Zeitschrift f. analyt. Chemie 1886, XXV. S. 39.

[4]) Referat beim internat. Congress für Hygiene. Virchow's Archiv 1887, Bd. 110.

[5]) Zeitschrift für Hygiene 1888, IV. S. 25; 1889, V. S. 428.

[6]) ibid. 1888. IV. S. 192.

Metachromasie) nachweisen könne, welche bald als Endosporen, Arthrosporen, Vorstadien der Sporenbildung (sporogene Körner) oder Kerne gedeutet wurden.

Die Darstellung der Körner gelingt 1) mit alkalischem Methylenblau, welches man in der Kälte 15 Minuten einwirken lässt (Babes): die Körner erscheinen roth (in verschiedener Intensität) bis röthlich-violett in den ganz schwach blau gefärbten Bakterien und sind in Bezug auf Lagerung und Grösse nicht ganz gleich. 2) Die Präparate werden mit warmer (nicht siedender) Lösung des alkalischen Methylenblau gefärbt, in Wasser abgespült und 1 bis 2 Minuten mit wässriger Vesuvinlösung nachgefärbt (Ernst): die Körner sind dunkelblau, fast blauschwarz auf leicht braunem Grunde. 3) Intensive Färbung mit Hämatoxylin von Delafield (Ernst): die Körner werden schwarzviolett auf leicht lila Grund. 4) Bei schwachem Anfärben mit Delafield'schem Hämatoxyilin erscheinen nach Bütschli die Körner rothviolett (Farbe des angesäuerten Hämatoxylins), die Centralkörper der Bakterien selbst blau (alkalisches Hämatoxylin). 5) Mit Kernschwarz (Ernst) erscheinen die Körner schwärzlich auf rauchgrauem Grunde. Die Körner werden nicht durch künstlichen Magensaft, wohl aber durch alkalisches Trypsin verdaut, gelöst. Hiernach sind die obigen Annahmen der Natur der Körner unrichtig. Die Körner sind vielmehr nach Bütschli[1]) **Chromatinkörnchen.** Durch diese Beobachtung und die Art der Anordnung dieser Körner wird die zuerst von mir[2]) begründete Ansicht, dass das Wesentliche des Inhalts, das sogenannten Protoplasma der Bakterien kein Homologon des Protoplasma der Zellen, sondern der **Kern** ist, durch Bütschli exacter begründet. Je nach der Grösse der Bakterien wird aber um diesen Kern weniger oder mehr ächtes Protoplasma nachweisbar, aus dem sich erst die Membran mit den Geisselscheiden differenziren, während hiernach die wirklichen Geisseln Fortsätze des ächten Protoplasmamantels der Kernsubstanz sein müssen. Bei der Theilung verhält sich die Kernsubstanz, d. h. der grössere und wesentlichste Theil des Inhalts, wie ich im Kapitel

[1]) Ueber den Bau der Bakterien, 1890.
[2]) Die Formen der Bakterien 1886, S. 94.

über Morphologie kurz andeutete, wie ein Kernfaden mit seiner achromatischen Hülle.

Zur Färbung von anderen Mikroorganismen, besonders von **Amoeben** und **Infusorien**, in Deckglaspräparaten empfiehlt sich folgendes Verfahren, welches mir Dr. Zimmermann mittheilte. Nachdem die Form dieser Organismen in einer der früher (S. 58) geschilderten Weisen durch Sublimat oder Alkohol oder Chromsäuregemische fixirt ist, werden dieselben in ein Spitzglas übertragen, welches 50 %igen Alkohol enthält; hierin werden sie gut ausgewaschen und durch Einblasen von Luft öfters in die Höhe getrieben. Nach dem Auswaschen wird mit Karmin gefärbt. Ein Theelöffel Karmin wird in 200 ccm 70 %igem Alkohol gekocht und der Masse 15 Tropfen Salzsäure zugesetzt. Von dieser Lösung verwendet man einen Theil, welcher mit der gleichen Menge 70 % Alkohol verdünnt wird; diese Lösung muss ca. eine Stunde einwirken. Nach der Färbung wird eine Stunde lang mit 50 % Alkohol ausgewaschen; darauf folgt eine halbe Stunde lang 70 % und darauf ebenso lange absoluter Alkohol. Die Aufhellung erfolgt in Lavendelöl und der Einschluss in Balsam.

Pilze werden in Deckglas-Trockenpräparaten am besten mit basischen Anilinfarben gefärbt.

---

8. Schnittpräparate.

Zur Herstellung von Schnitten zum Nachweise von Mikroparasiten im Gewebe hat man unbedingt ein Mikrotom nöthig.

Von den Mikrotomen mit freier Führung des Messers durch die Hand ist für unsere Zwecke nach Kitt[1]) nur das „Cathcart“-Mikrotom geeignet, welches sich seines geringen Preises halber besonders für Aerzte empfehlen dürfte. In Laboratorien ist ein exacteres Instrument unentbehrlich, bei dem sowohl Messer als Präparat durch

[1]) Bakteriologische und pathologisch-histologische Uebungen 1889, S. 326.

Schlittenverschiebung mechanisch bewegt werden. Es sind zwei grundsätzlich verschiedene Constructionen zu unterscheiden. Bei der einen steigt die Objectbahn gegen die Messerbahn langsam an, so das stets eine gegenseitige Verschiebung erfolgt, das Object seine Stellung wechselt und das Messer nicht ganz ausgenutzt werden kann; ein gutes und billiges Instrument dieser Art ist von Katsch in München; die besten Instrumente dieser Art sind von Thoma-Jung in Heidelberg und Spengel-Becker in Göttingen. Ich ziehe die zweite Construction entschieden vor. Bei dieser bleibt das Object stets an derselben Stelle am Anfang der Schlittenbahn und wird nur senkrecht gehoben oder gesenkt. In Folge dieser Lage des Objectes kann das Messer seiner ganzen Länge nach ausgenutzt werden. Die ersten guten Instrumente dieser Art sind von Weigert erdacht und von Schanze-Leipzig ausgeführt. Aehnlich ist das Mikrotom von Miehe-Hildesheim. Eine mechanische Verbesserung der Messerführung des Weigert-Schanze'schen Modell's hat Altmann angegeben. Das beste, aber auch sehr theuere Instrument dieses Prinzips ist das von Schiefferdecker-Becker in Göttingen. Mikrotome für Serienschnitte sind bis jetzt für unsere Zwecke noch nicht verwerthbar.

Das Messer des Mikrotoms muss so gearbeitet sein, dass seine untere plane Schneidefacette genau parallel der Gleitebene des Messerschlittens steht. Dasselbe muss nach jedem Gebrauche sofort abgetrocknet und (mit dem Rücken voran) auf einem festen Streichriemen, ohne Druck und gleichmässig abgezogen werden. Auf diese Weise hält man sich ein gutes Messer jahrelang gebrauchsfähig, was um so wichtiger ist, als das Abziehen auf dem Stein fast nie das Messer im selben Zustande lässt wie vorher.

Die Messerstellung ist in der Regel, um Druck zu vermeiden und den richtigen Zug zum Schneiden zu treffen, so zu wählen, dass das Messer möglichst spitzwinklig zum Präparate steht, damit die Schneide möglichst ganz ausgenutzt wird. Für Schnitte, welche mit dem Gefriermikrotom geschnitten werden, wird das Messer nicht befeuchtet; für Spirituspräparate erfolgt Befeuchtung mit Spiritus oder absolutem Alkohol; für Celloidin mit 80$^0/_0$ Alkohol; Paraffinpräparate werden trocken geschnitten.

Die Dicke der Schnitte muss für Beobachtungen feiner Einzelheiten zwischen 1 und 2 μ liegen. So feine Schnitte sind jedoch nur bei Paraffineinbettung zu erzielen. Bei Celloidineinbettungen fallen die Schnitte stets etwas stärker aus und bei feuchten Schnitten (z. B. bei Verwendung des Gefriermikrotoms) muss man mit Schnitten von 10 μ schon zufrieden sein. Die Dicke der Schnitte richtet sich übrigens nicht nur nach der Einbettungsmethode, sondern auch nach der Art der Gewebe, so dass es ganz unmöglich ist, stets absolut gleich dicke Schnitte zu erhalten.

Um diesen Forderungen entsprechende Schnitte zu erhalten, wählt man für das Gefriermikrotom Stücke, welche nicht höher als 4 mm, für die andern Methoden solche, die nicht höher als etwa 8 mm sind.

A) **Frische Organe** kann man mit dem Gefriermikrotom sofort in Schnitte zerlegen. Beim Schneiden darf das Stück nicht hart gefroren sein, weil sich dabei die Schnitte einrollen, sondern es muss nur eben hart genug sein. Die Schnitte werden mit Pinsel oder Nadel in 0,5 % Kochsalzlösung übertragen und können ungefärbt untersucht werden. In der Regel werden die Schnitte in der Salzlösung mit Hülfe von Glas- oder Metallnadeln gut ausgebreitet, auf einem Spatel aufgefangen und derart vorbereitet herausgenommen. Dann wird die überflüssige Flüssigkeit mit Fliesspapier abgetupft oder abgesaugt und nunmehr der Schnitt unter langsamem Senken des Spatels in absoluten Alkohol übertragen, in dem er mindestens so lange bleiben muss, bis alle beim Aufthauen entstandenen Luftblasen verschwunden sind. Heller[1]) empfiehlt die frischen Stücke ca. 1 Stunde lang in eine dünne Chromkalilösung zu legen und dann nach Abspülen in Wasser zu schneiden, weil sich dann die rothen Blutkörperchen gut halten. Um frische Schnitte längere Zeit zu erhalten, setzt er der 0,5 % Kochsalzlösung 1 % Chloralhydrat zu.

Nach Friedländer[2]) kann man zwar die Schnitte direct aus der Kochsalzlösung in Farblösung, besonders in Vesuvin bringen,

---

1) Zeitschrift f. wissenschaftl. Mikroskopie 1885, Bd. II, S. 47.
2) Mikroskopische Technik, 2. Aufl., S. 119.

in der Regel ist es aber zum Färben nach Weigert[1]) erforderlich, die Schnitte vor dem Färben in der angegebenen Weise in Alkohol zu härten und zu entwässern.

In den frischen oder gehärteten, **nicht gefärbten** Schnitten werden Bakterien durch ihre Resistenz gegen Säuren und Alkalien nachgewiesen. Die Schnitte werden durch 50%ige Essigsäure oder 1 bis 3%ige Kali- oder Natronlauge sehr stark aufgehellt. Die Bakterien widerstehen dieser Behandlung nach v. Recklinghausen (S. 60). Alte Spirituspräparate werden in diesen Lösungen bis zur Blasenbildung erwärmt. Die Bakterien sind in solchen durchsichtig gemachten Präparaten zum Theil an der charakterischen Form der einzelnen Bakterien zu erkennen, wie es von Baumgarten für Tuberkelbacillen, von Friedländer für Ileotyphus gefunden wurde. Bei den nicht durch scharfe Form der Einzelindividuen markirten Bakterien, besonders den Kokken, macht sich die Gruppenbildung, Doppelkokken, Tetraden, Packete, Ketten, Zoogloea, bemerkbar. Diese gleichmässigen Körner widerstehen dem Aether und Chloroform, welche Fetttröpfchen, mit denen eine Verwechslung möglich wäre, auflösen. In den Gefässen markiren sich die Kokkenanhäufungen nach v. Recklinghausen bisweilen dadurch, dass sie in Folge ihres Wachsthums die Gefässe varicös auftreiben. „Wenn wir in einem Schnitte, der vom frischen oder in Alkohol gehärteten Organ herrührt, Haufen oder Ketten kleiner Körnchen finden, die unter sich von annähernd gleicher Grösse sind, die so wohl der Bahandlung mit Alkohol und Aether, als auch der energischen Einwirkung von concentrirter Essigsäure und der Alkalien auch beim Erwärmen resistiren, so sind wir nach Friedländer's Zusammenfassung[2]) berechtigt, die Körner als Organismen anzusprechen".

Das Schneiden frischer Organe auf dem Gefrier-Mikrotom ist für bakteriologische Studien eine meist recht überflüssige Arbeit. Deckglaspräparate aus dem Gewebssafte orientiren über Vorkommen und Menge von Bakterien schneller und besser und zu histologischen

---

1) Virchow's Archiv 1881, Bd. 84, S. 290.

2) Mikroskopische Technik, 2. Aufl., S. 46.

Studien ist das Gefrieren nicht sonderlich geeignet, weil durch das Frieren und Wiederaufthauen die Gewebe stark leiden.

B) **Das Fixiren und Härten der Gewebe.** Die Färbbarkeit der Gewebselemente, besonders der Albuminate hängt sehr von ihrem Gehalte an Wasser und überhaupt von der physikalischen Beschaffenheit der Gewebe ab. Da bei vielen Härtungsverfahren zunächst das fixirte und coagulirte Eiweiss eine gewisse Menge Wasser noch zurückhält, erfolgt zum Schlusse zur definitiven und gleichmässigen Entwässerung meist eine kürzere oder längere Uebertragung in absoluten Alkohol.

Noch besser dürfte nach Altmann[1]) dieser Zustand zu erreichen sein, wenn man die frischen Organstückchen gefrieren lässt und dieselben im gefrorenen Zustande bei einer Temperatur von — 20° C. über Schwefelsäure im Vacuum austrocknet. Wählt man eine höhere Temperatur als diese kritische, bei der Salzlösungen fest werden und bleiben, so tritt ein Schrumpfen ein, wie bei andern Arten des Austrocknens, während bei Innehalten dieser niedrigen Temperatur das Volumen unverändert bleibt.

Derartige Vorbereitungen sind nöthig, um die Gewebe und die aus denselben hergestellten Schnitte färben zu können und auf dem Wege der Farbelection eine mikrochemische Reaction für die verschiedenartigen normalen und abnormen Gewebselemente und eingelagerten Mikroparasiten zu gewinnen. Um die nöthige Feinheit der Schnitte für das Erkennen solcher Einzelheiten zu erreichen, muss das Gewebsstück zum Schneiden auch geeignet hart sein. Diese Härte wird zum Theil durch Beeinflussung der Albuminate (Gerinnung des Protoplasma), zum Theil auch durch Bildung anorganischer Niederschläge durch einige Härtungsmittel erreicht. Die Härtung muss also derart geschehen, dass dadurch die Formeigenthümlichkeiten nicht oder nicht wesentlich verändert werden. Die Härtung muss also selbst gleichzeitig ein Fixiren bewirken oder es muss eine besondere Fixirung vorausgehen.

Will man nur auf die Anwesenheit bestimmter Elemente prüfen, so kann man die anderen Gesichtspunkte mehr zurücktreten lassen.

---

[1]) Die Elementarorganismen 1890, S. 22.

Muss man aber das gegenseitige Verhältniss aller normalen und fremden Formelemente beobachten, wie es mehr und mehr sich als nothwendig herausstellt, so muss man oft mehrere Processe nach- oder nebeneinander einwirken lassen.

Durch das Fixiren soll das noch lebende, unveränderte Gewebe möglichst momentan getödtet werden, um keine Zeit zum Eintreten von Veränderungen zu lassen. Man überträgt deshalb die kleinen Organstückchen bei der sofort nach dem Tode des Warmblüters vorzunehmenden Section in die 37° warme Fixirungsflüssigkeit. Bei Sectionen vom Menschen muss man die Stückchen, weil zu lange Zeit seit dem Tode verflossen ist, von möglichst intacten Parthien entnehmen. Bei Beachtung dieses Gesichtspunktes gelingt es auch die postmortalen Veränderungen, Auflösung und Fäulniss der Gewebe, richtiger zu beurtheilen, weil man diesen Vorgang jedes Mal nach Wunsch unterbrechen kann. Das Fixirungsmittel muss aber auch schnell eindringen, damit alle Zellen und Formelemente und nicht nur die äusseren fixirt werden, damit nicht im Inneren die Zersetzung oder Fäulniss platzgreifen kann.

Manche Mittel, wie Pikrinschwefelsäure, tödten die Zellen gut, fixiren also, härten aber wenig oder gar nicht; andere bringen wohl das Protoplasma zur Gerinnung, aber dies genügt nicht zur Härtung, weil sie wie z. B. Schwefelsäure das Bindegewebe zum Quellen bringen. Organische Säuren fixiren in verdünnten Lösungen bei kurzer Einwirkung die Kerne, indem sie das Nucleïn unlöslich machen, welches jedoch durch schwache Säuren bei längerer Einwirkung oder durch stärkere Säuren bei kürzerer Einwirkung wieder gelöst wird. Chromsäure ruft im Eiweiss gewebsähnliche, zu Täuschungen veranlassende Bilder hervor, muss also anderweitige Correctur erfahren. Aehnlich, nur nicht so stark, wirkt Alkohol, doch verschwinden diese störenden Bilder theilweise wieder nach Entfernung des Alkohols; absoluter Alkohol darf demnach nur kurze Zeit einwirken. Keinerlei gewebsähnliche Niederschläge bewirken Chromsalze, Cuprisulfat, Sublimat, Platinchlorid. Alle diese ausgezeichneten Fixirungsmittel härten nicht genug und ihre Anwendungsweise schwankt, wie die aller in Betracht kommenden Mittel, nach der Natur der zu fixirenden und zu härtenden Objecte ganz ausser-

ordentlich. Man ist deshalb unter Beachtung obiger allgemeiner Gesichtspunkte gezwungen, sich die richtigen Mittel und Mischungen von Fall zu Fall auszuprobiren. Jedes Gewebe, jedes Organ jeder besonderen Species, jeder Mikroparasit hat ein anderes bestes Fixirungs- und Härtungsmittel.

Die Conservirung der richtig fixirten und gehärteten Gewebe erfolgt meist in Alkohol, der nach obigem nie absolut, sondern mit Wasser oder Kochsalzlösung verdünnt sein sollte; für einzelne besonders empfindliche Objecte dürfte nach Kultschitzky Aether oder Xylol vorzuziehen sein.

Von für unsere Zwecke brauchbaren Mitteln zum Fixiren und Härten führe ich an: Die directe Härtung in Alkohol erfolgt in der Weise, dass man kleine Stückchen bis zu höchstens Haselnussgrösse mindestens drei Tage lang in einer grossen Menge oft gewechseltem absolutem Alkohol liegen lässt. Man bringt erst eine lockere Lage Fliesspapier in das Gefäss und legt die Organe auf das Fliesspapier. So lange nämlich der Alkohol noch Wasser aus der Luft und den Organen aufnehmen kann, wird er verdünnt und schwerer und sammelt sich unter dem Fliesspapier, während sich über demselben der leichtere wasserfreie Alkohol befindet. Diese gewöhnliche Art der Alkoholhärtung lässt histologisch oft viel zu wünschen übrig, ist aber brauchbar, wenn man nur den Nachweis von Bakterien führen will. Besonders schwer durchdringbare Objecte muss man sogar mit kochendem absoluten Alkohol behandeln.

Histologisch bei weitem besser wird die Härtung in Alkohol in dem Dialysator von F. E. Schulze (S. 58) vorgenommen. Man muss dann Stückchen der lebenswarmen Organe in einer 0,5 % Kochsalzlösung von 37° C. in das kleine Gefäss einbringen.

Die Härtung in Chromsäure und doppelchromsaueren Salzen erfordert selbst bei kleinen Stücken bei Zimmertemperatur 8 bis 10, bei 30 bis 40° C. 4 bis 6 Tage. Man muss grosse Mengen Flüssigkeit nehmen und in den ersten Tagen öfters wechseln. Hat man die Härtung ohne besondere Rücksicht auf Licht und Dunkelheit vorgenommen, so müssen die gehärteten Stücke stundenlang in öfters zu erneuerndem Wasser ausgewaschen werden, bis dasselbe ganz klar bleibt. Dann werden sie in 90 % und darauf in absoluten

Alkohol übertragen. H. Virchow[1]) zeigte, dass man bei strengem Ausschluss von Licht während der Härtung die in Chromsäure gehärteten Organe ohne vorheriges Auswässern direct in Alkohol übertragen kann. Auch wenn man nach Abgiessen oder Filtriren des gelb gefärbten Alkohols, dieses Uebertragen in Alkohol der Vorsicht halber wiederholt, spart man doch viel Zeit gegenüber dem langwierigen Auswaschen in Wasser und vermeidet ungünstige Veränderungen des Präparates. Der reinen Chromsäure vorzuziehen sind folgende Mischungen, welche schon in 6 bis 24 Stunden aussreichend härten.

Merkel[2]) verwendet je 1 Theil Platinchlorid und Chromsäure in 800 Theilen Wasser. Brass[3]) empfiehlt: Je ein Theil Chromsäuse, Platinchlorid und Essigsäure auf 400 bis 1000 Wasser. Die chromsauren Salze finden oft Anwendung in Form der Müller'schen Lösung, welche aus 2 Kalibichromat, 1,0 Natron sulfuricum und 100 aq. dest. bereitet wird. Sehr gut ist auch die Mischung von Kultchitzky[4]), zu 50% Alkohol wird feingestossenes doppelchromsaures Kali und schwefelsaures Kupferoxyd ad libitum zugesetzt und während 24 Stunden im Dunkeln gelöst. Der klaren Lösung werden pro 100 ccm 5 Tropfen Essigsäure zugesetzt. Die Fixirung im Dunkeln geschieht in 24 Stunden; die Nachhärtung erfolgt in absolutem Alkohol in 24 Stunden.

Sublimat wurde zuerst von Blanchard verwendet und besonders von Lang[5]) eingeführt. Der letztere hat auch die Verbindung mit Kochsalz, Essigsäure und Pikrinschwefelsäure zuerst angewendet. Die Organstückchen kommen möglichst lebenswarm nach Lang in siedend heisse, nach Brass[6]) in eine 60 bis 70° warme 5% Sublimatlösung, in der sie bei Erbsengrösse ca. 10, bei Wallnussgrösse bis zu 30 Minuten verbleiben. Aus dem Sublimat muss das Gewebsstückchen sofort in viel 70 bis 80% Alkohol über-

---

[1]) Arch. f. mikroskop. Anatomie 1885, Bd. 24, S. 117.
[2]) Ueber die Macula lutea des Menschen 1870.
[3]) Zeitschrift f. wissenschaftl. Mikroskopie 1884, Bd. I, S. 49.
[4]) Zeitschrift f. wissenschaftl. Mikroskopie 1887, Bd. IV, S. 348.
[5]) Zoologischer Anzeiger 1878, I, S. 14, 1879, II, S. 46.
[6]) Zeitschrift f. w. Mikroskopie 1885, Bd. II, S. 302.

tragen werden, in dem es mindestens einen Tag verbleibt, von hier kommt es in 90 % und darauf in absoluten Alkohol, so dass die Härtung in 2 Tagen vollendet ist. Um nicht durch Sublimatkrystalle gestört zu werden, setzt man nach P. Mayer[1]) dem Alkohol Jodtinctur zu, am besten jedesmal dem frischen Alkohol von vornherein einen Tropfen.

Diese starke Lösung zerreisst oft den Zusammenhang der Zellen und ich verwende deshalb oft vortheilhaft eine Lösung von 0,5 % Sublimat und 0,5 % Kochsalz bei 37°, welche Lösung eine halbe bis eine Stunde einwirkt. List[2]) empfiehlt einem Ccm einer halbgesättigten wässrigen Sublimatlösung einen Tropfen Pikrinschwefelsäure zuzusetzen. Rabl nimmt gleiche Theile von concentrirter wässriger Sublimatlösung, concentrirter wässriger Pikrinsäure und Aq. dest. Die Dauer von 24 Stunden kann durch Erwärmen auf einige Stunden abgekürzt werden.

Pikrinsäure wird in concentrirter wässriger Lösung verwendet. In derselben bleibt das lebenswarme Stückchen 1 bis 2 Tage; dann wird es etwa 24 Stunden in fliessendem Wasser ausgewaschen und darauf in 50 % und von hier allmählich in absoluten Alkohol übertragen. Die Pikrin-Schwefelsäure von Kleinenberg wird meist so dargestellt, dass man in einer Lösung von 2 Volumen concentrirter Schwefelsäure in 100 Volumen Wasser soviel Pikrinsäure zusetzt, wie sich in der Kälte löst, abfiltrirt und die klare Lösung mit 3 Theilen Wasser verdünnt.

Zum Nachweis der Mikroparasiten muss in der angegebenen Weise das Härtungsmittel wieder gründlich entfernt werden. Sublimat- und Pikrinsäurelösungen eignen sich gleichzeitig trefflich zur Darstellung der Kerntheilungsfiguren und zu Kernfärbungen mit Hämatoxylin.

Für die histologischen Studien allein ist das von Flemming angegebene Härtungsgemisch oft noch vorzuziehen. Leider werden die Gewebe bei allen Osmiumsäure enthaltenden Lösungen so dunkel, dass dadurch Bakterien in den Zellen verdeckt

---

[1]) Internationale Monatschrift für Anatomie und Physiologie 1887, IV. S. 43.

[2]) Zeitschrift f. w. Mikroskopie 1886, Bd. III, S. 44.

werden können. Doch ist es nicht ganz richtig, dass sich in den in Osmiumsäure enthaltender Lösung gehärteten Gewebe Bakterien nicht färben lassen; mindestens mit Karbolsäure als Beize gelingt es und ich halte deshalb diese Lösung zur Ergänzung anderer Härtungsmittel für sehr wünschenswerth. Man muss nur recht feine Schnitte anfertigen.

Die von Flemming[1]) selbst empfohlene Lösung besteht aus:

1 °/₀ Chromsäure	15	Maasstheile
2 °/₀ Osmiumsäure	4	„
Eisessig	1	„

In dieser Lösung bleiben die kleinen Stückchen 2 bis 3 Tage und noch länger. Zum Gebrauche werden sie mindestens eine Stunde in gewöhnlichem Wasser ausgewaschen und in absolutem Alkohol nachgehärtet resp. entwässert.

Altmann[2]) mischt gleiche Theile einer 5 °/₀ Lösung von Kaliumbichromat und einer 2 °/₀ Lösung von Ueberosmiumsäure. Die Organstückchen bleiben 24 Stunden in dieser Lösung, werden dann mehrere Stunden in fliessendem Wasser ausgewaschen und in 70 °/₀ und darauf in 90 °/₀ oder absoluten Alkohol übertragen.

Podwyssozki[3]) empfiehlt:

0,5 °/₀ wässrige Sublimatlösung, in der 1 °/₀ krystall. Chromsäure gelöst ist	15 ccm
2 °/₀ Osmiumsäure	4 „
Eisessig	6 bis 8 Tropfen

In dieser Flüssigkeit bleiben die Stücke 3 bis 4 Tage, werden bis zu einem Tage ausgewaschen und dann in 60 °/₀, darauf in 80 °/₀ und schliesslich in absoluten Alkohol übertragen.

Fol hat angegeben:

1 °/₀ Ueberosmiumsäure	2	Volumina
1 °/₀ Chromsäure	25	„
2 °/₀ Essigsäure	8	„
Wasser	68	„

1) ibid. 1884, Bd. I, S. 349.
2) Die Elementarorganismen 1890, S. 27.
3) Zeitschrift f. w. Mikroskopie 1886, Bd. III, S. 405. (Referat).

In der Fol'schen Lösung bleiben die Schnitte mindestens 24 Stunden, werden dann gründlich ausgewaschen und in 80 % und darauf in absoluten Alkohol übertragen. Ich empfehle sämmtliche Härtungen, wenn irgend möglich, in der ersten Zeit 1 bis 2 Tage lang bei Bruttemperatur im Dunkeln vorzunehmen.

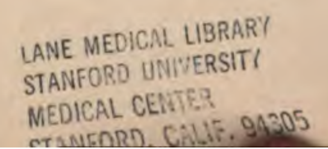
Das Entkalken wird bisweilen als Vorbereitung nöthig. Die Chromsäure ist hierfür sehr zu empfehlen, weil sie gleichzeitig härtet und langsam entkalkt. Die Flüssigkeit muss öfters, anfangs täglich erneuert werden.

Gesättigte wässrige Pikrinsäure entkalkt schneller, aber sie muss doch mehrere Tage lang einwirken und dies ist oft für die gleichzeitige und schonende Härtung zu viel. Noch mehr gilt dies von der Ebner'schen Salzsäurelösung (S. 112) und von 3 % Salpetersäure. Die letztere erhält aber die Kerntheilungsfiguren so gut, dass sie gleichzeitig als Härtungsmittel in Betracht kommt. Bei Verwendung von Pikrinsäure, Salzsäure nud Salpetersäure zum Entkalken vermeidet man zu starken Einfluss auf die Gewebe am besten dadurch, dass man die Stücke Knochen etc. vorher in Alkohol härtet. Statt dessen kann man auch 3 Vol. Salpetersäure mit 97 Vol. 90 % Alkohol verwenden.

Das Entfetten geschieht zum grössten Theil und für viele Fälle in genügender Weise bereits durch die Alkoholeinwirkung. Reicht dies nicht aus, so kommen die kleinen Organstücke oder die Schnitte aus dem Alkohol ca. 15 Minuten in Aether oder Chloroform und dann wieder in Alkohol, dies muss ev. einige Mal wiederholt werden.

Das Befestigen der gehärteten Organe auf dem Mikrotom als Vorbereituug zum Schneiden.

a) Das Stückchen wird aus dem Alkohol in eine grössere Schale mit Wasser gebracht und bleibt bei Zimmertemperatur bis zu 4 Stunden, bei 30 bis 40 ° bis zu einer Stunde darin. Das so von Alkohol befreite Stückchen wird durch den Aetherspray des Gefriermikrotoms an der Platte des letzteren angefroren. Das Material soll durchfroren und darf doch nicht zu hart sein, wenn man gute und gleichmässige, nicht zu dicke



Schnitte erzielen will. Ohne besondere Uebung ist diese Beurtheilung nicht zu erlernen. Das Messer wird nicht befeuchtet und die Schnitte werden mit Pinsel oder Nadel in 0,5 % Kochsalzlösung übertragen und dann zum Entwässern in absoluten Alkohol gebracht. Will man nur auf Bakterien untersuchen, ohne das feinere histologische Verhalten zu studiren, so empfiehlt sich diese Methode durch ihre Bequemlichkeit.

b) Das Aufkleben auf Kork. Das Organstückchen wird mit Fliesspapier abgetrocknet und ev. vorher einen Moment in Wasser gelegt und dann oberflächlich abgetrocknet. Dann bestreicht man nach Weigert den oberflächlich rauh gemachten Kork mit „flüssigem Leim" und legt das Gewebsstück darauf, drückt es leicht an und bringt es dann in absoluten Alkohol. Durch das Erstarren des Leimes im Alkohol wird zwischen Gewebe und Kork eine feste Brücke hergestellt. Statt des flüssigen Leimes kann man auch Lösungen von arabischem Gummi oder die in der Wärme verflüssigte Klebs'sche concentrirte Glycerin-Hausenblasengallerte verwenden oder die in der Wärme zu verflüssigende Glycerin-Gelatine von Kaiser: 1 Gelatine, 7 Glycerin und 6 Wasser; auf 100 gr der Mischung kommt 1 gr Karbolsäure. Das Messer wird mit Alkohol befeuchtet und die Schnitte werden mit Nadel oder Pinsel direct in ein Schälchen mit absolutem Alkohol übertragen.

c) Einbetten in Celloidin nach Schiefferdecker und Blochmann. Das klein zerschnittene Celloidin wird in gleichen Theilen Alkohol und Aether gelöst und zwar als dünnflüssige Lösung und als stärkere Lösung von Syrupconsistens. Die in absolutem Alhohol entwässerten Schnitte können meist direct in die dünnere Lösung gebracht werden, in der sie zum Durchtränken mit Celloidin bis zu einem Tage bleiben. Schwer durchdringbare Objecte bringt man aus dem Alkohol einige Stunden in gleiche Mengen Aether und Alkohol und erst von hier in die dünnere Celloidinlösung. Von hier kommen die Stücke einige Stunden bis Tage in die dickere Lösung. Dann bereitet man sich einen gut gerundeten Kork, dessen Oberfläche rauh gemacht

wird, derart, dass man ihn ringförmig mit einem Papierstreifen umgiebt, den man mit einer Nadel am Kork befestigt. Man erhält dadurch ein Kästchen von Papier mit Kork als Boden. Diesen Korkboden befeuchtet man mit absolutem Alkohol und bringt nunmehr die Stücke mit der dickeren Celloidin-Lösung auf den Kork. Von unten beschwert man den Kork mit einem Bleistückchen, welches von einem Stifte durchbohrt ist, so dass das Papierkästchen in Flüssigkeiten immer oben bleiben muss. Der so vorbereitete Kork wird nun in 80 % Alkohol eingesenkt und darin das Celloidin gehärtet. Nach eingetretener Härtung erfolgt das Schneiden unter Befeuchten des Messers mit 80 % Alkohol. Die Schnitte werden zunächst in 80 % Alkohol übertragen.

Anilinfarben färben leider das Celloidin, so dass die für Celloidin sonst übliche Entwässerung in 95 % Alkohol (absoluter Alkohol löst das Celloidin und ist deshalb nicht zu gebrauchen) meist nicht zu gebrauchen ist. Nur bei der Weigert'schen Methode des späteren Entwässerns und Differenzirens mit Anilinöl scheint das Celloidin nicht zu stören.

In anderen Fällen, in denen man mit Anilinfarben färbt, muss man deshalb das Celloidin vor dem Färben aus den Schnitten entfernen. Dies geschieht, indem man die Schnitte aus dem 80 % Alkohol für einige Stunden in absoluten Alkohol überträgt; hierbei werden die Schnitte auch entwässert, aber leider wird dadurch der Verband der Elemente gelockert.

Die Einbettung in Paraffin geschieht in der Weise, dass man das in Alkohol gehärtete oder nachgehärtete Object in eine Mischung von ein Theil Alkohol zu 3 Theilen Xyol, dann in eine Mischung von Xyol und Paraffin und endlich in verflüssigtes Paraffin überträgt. Nelkenöl ist für Bakterien zu vermeiden. Das Paraffin wird in besonderen Oefen oder in einem Thermostaten flüssig gehalten und zwar in einem Kästchen aus Metall, Papier oder Holz. Paraffin von richtigem Schmelzpunkt erhält man durch Mischen verschiedener Sorten. Paraffin mit Schmelzpunkt von 58—60° liefert die feinsten Schnitte, aber diese Temperaturen sind für viele pathologischen Formen viel

zu hoch und deshalb ist die Paraffinmethode für unsere Zwecke bis jetzt nicht beliebt geworden. Nach Uebertragen der Schnitte in das flüssige Paraffin mit warmen Instrumenten und nach Orientierung des Präparates in dem Kästchen (zum Zwecke des Auffindens in dem nach dem Erstarren undurchsichtigen Paraffin) wird das Paraffin durch Umgiesen des Kästchens mit kaltem Wasser zum Erstarren gebracht. Da die mit Paraffin durchtränkten Schnitte trocken und brüchig sind, so kann man in der Regel die Entfernung des Paraffin nicht einfach durch Uebertragen der Schnitte in Xyol bewirken, sondern die Schnitte werden mit ihrem Paraffin auf den Objectträger aufgeklebt, der zu diesem Zwecke mit einer dünnen Schicht von Nelkenöl und Collodium (3:1), oder von Eiweiss, oder Glycerin, oder von alkoholischer Schellacklösung, oder von Kautschuck (Traumaticin mit 25facher Menge Chloroform) überzogen wird. In den ersten Fällen wird der Schnitt angedrückt und 10 Minuten im Brütofen bei 60° belassen; dann kommt der Objectträger mit dem angeklebten Schnitt in Xyol. Im letzten Falle wird er angepinselt mit einer Lösung, welche derart hergestellt wird, dass 2 gr Schiessbaumwolle in 50 cm Aceton gelöst und von dieser Lösung 5 ccm mit 20 ccm Alkohol verdünnt werden. Nach diesem Anpinseln müssen die Schnitte mit Fliesspapier stark an den Objectträger angedrückt werden. Darauf werden sie im Wärmeschrank oder über der Flamme an den Objectträger angetrocknet und in Xyol gebracht. Auf das Xyol folgt absoluter Alkohol.

Eine Combination von Celloidin- und Paraffineinbettung dürfte für pathologische Fälle vorzuziehen sein, bei denen man besonders feine Schnitte wünscht. Das Organstückchen kommt aus dem Alkohol einige Stunden in Alkohol-Aether, dann in Celloidinlösung und wird dann in Paraffin eingebettet wie oben. Es kann trocken geschnitten werden.

Zum Studium mancher in Kulturen beobachteten Formen und von Formelementen flüssiger Gewebe hat man in den letzten Jahren erfolgreich versucht, die Kulturen und derartige Gewebe, wie Blut, zu härten und mit dem Mikrotom zu schneiden.

Für Kulturen sind derartige Methoden angegeben von Garrè[1], Plaut[2], Fischl[3], Weigert[4], Neisser und Jacobi[5]; für Blut von Biondi[6]. Kolonien, welche auf Platten- oder Objectträgerkulturen in Gelatine oder Agar gewachsen sind, werden mit sterilisirtem Messer umschnitten und darauf mit ev. befeuchtetem Spatel aufgenommen und auf einen Objectträger übertragen. Um die Uebertragung glatt auszuführen, kann man auch vorher auf den Objectträger einen Tropfen sterilisirtes Wasser geben, in den man die ausgehobene Kolonie einsetzt. Das überflüssige Wasser wird dann mit Fliesspapier abgesaugt und nun kann man entweder a) die in Gelatine oder Agar in situ liegende Kolonie an der Luft oder im Exsiccator etwas an- und eintrocknen lassen. Dann giebt man nach Garrè einen Tropfen eben flüssiger Glyceringelatine auf die Kolonie und legt sofort das Deckglas auf. Oder b) man erwärmt den Objectträger leicht über einer Flamme, so dass die Gelatine anfängt zähflüssig zu werden, und legt dann nach Plaut das Deckglas direct auf die Gelatine. Nach dem Wiedererstarren der Gelatine zieht man einen Lackring um das Präparat. Nach Jacobi bringt man die Kulturplatten in flache Schalen und übergiesst sie mit einer 1 % Lösung von Kali bichromicum, in welcher sie 1 bis 3 Tage im Lichte stehen bleiben. Durch das Stehen im Lichte bildet sich eine in Wasser unlösliche Modification der Gelatine und dieselbe wird ganz klar und durchsichtig. Dann werden die Kulturen von den Platten mit einem Spatel herunter gehoben und 24 Stunden in Wasser ausgewaschen und zuerst in 50 %, nach 12 bis 24 Stunden in 70 %, dann in 96 % Alkohol übertragen. Bei sehr dünnen Kulturen kommen kleine Stückchen von hier direct in die Farbflüssigkeit, in der sie wie Schnitte behandelt werden.

---

1) Fortschritte der Medicin 1886, IV, No. 12.
2) ibid. No. 13.
3) ibid. 1887, V, No. 20.
4) ibid.
5) Centralblatt für Bakteriologie 1888, III, No. 16 und 17.
6) Archiv f. mikroskop. Anatomie 1887, Bd. 31, S. 103.

Um Stichkulturen zu härten, verfährt man folgendermaassen: Man schneidet oder sprengt entweder das Kulturglas auf und nimmt beliebig grosse Stücke Agar oder Gelatine mit dem gewünschten Abschnitte der Kultur mit scharfem Messer heraus oder man wärmt das Glas leicht an, so dass der Gelatinecylinder ganz herausgleitet, oder man sticht mit einem Korkbohrer den ganzen Impfstich aus. Die im Korkbohrer sitzenden Gelatine- oder Agarsäulen stösst man dann mit einem Glasstabe hervor und überträgt nunmehr die Gelatine oder das Agarstück mit der Kolonie sofort in 96 % Alkohol. Nach Neisser bringt man die Gelatinecylinder je nach der Grösse 1 bis 4 bis 8 Tage in eine 1 % Lösung von Kali bichrom. im Lichte. Darauf werden die Stücke in Wasser gründlich ausgewaschen und dann in 70 % und darauf in 96 % Alkohol übertragen. Nach der Härtung in Alkohol werden entsprechende Stücke mit Gummi auf Kork fixirt und wie Gewebestücke mit dem Mikrotom geschnitten. Die Färbung in basischen Anilinfarben gelingt gut, weil sich mitgefärbte Theile der Gelatine bei der Nachbehandlung in Alkohol oder Anilinöl wieder entfärben.

Biondi filtrirt 2 % Lösungen von Osmiumsäure derart, dass 20 ccm haltige Gläser je 5 ccm dieser Lösung enthalten. Mit blutwarmer Pipette wird nunmehr das Blut entnommen und davon lässt man 1 bis 2 Tropfen in 5 ccm dieser 2 % Osmiumsäurelösung fallen. Um ein Verkleben der einzelnen Elemente zu verhüten, vertheilt man sorgfältig durch Hin- und Herbewegen und lässt dann ruhig stehen. Dabei senken sich zuerst dis rothen, dann die weissen Blutzellen und die Blutplättchen und man kann die einzelnen Zellarten isolirt entnehmen. Man kann aber vor der Entnahme diese Elemente auf's Neue durch vorsichtiges Bewegen der Flüssigkeit in derselben gleichmässig vertheilen und von dieser Mischung des Blutes mit Osmiumsäure mittelst einer Pipette mit breiter Oeffnung 4—5 Tropfen entnehmen, welche man in etwa 5 ccm bei 37° flüssig gehaltenes Agar giebt. Durch rotirende Bewegung vertheilt man die Blut-Osmiumsäuremischung gut in dem flüssigen Agar und giesst dasselbe dann in Papierkästchen, in denen das Agar schnell erstarrt. Nach dem Erstarren folgt Härtung in 83 % Alkohol und dann Zerlegen in Schnitte. Die Herstellung des Agar wird später beschrieben.

Bei diesen Härtungen ist das Agar-Agar oft nicht schnittfähig. Man durchtränkt deshalb die Schnitte mit Bergamottöl, dann mit einer Mischung von Bergamottöl und Paraffin und endlich 12—24 Stunden in reinem Paraffin, welches während dieser Zeit im Brütofen gehalten wird und erst dann durch Erkalten zum Erstarren gebracht wird. Nach dem Schneiden erfolgt die Entfernung des Paraffin durch Bergamottöl, dann folgt Alkohol.

Schliffpräparate haben bis jetst nur ein ganz untergeordnetes Interesse für die Bakteriologie und Mikroparasitologie. Nach van Tieghem[1]) sollen fossile Pflanzentheile, welche in mehr oder minder macerirtem Zustande verkieselt sind, auf Dünnschliffen dieselbe Art der Zerstörung der Zellwände erkennen lassen, welche für die Cellulosegährung charakteristisch ist. Dabei fand van Tieghem die verkieselten Reste einer Bakterie, welche er für Amylobakter s. Clostridium butyricum erklärte.

W. Roux[2]) fand in Knochenschliffen aus dem Rippenstück einer im vorigen Jahrhundert ausgestorbenen Seekuh, Rhytina Stelleri, von den Knochenkanälen ausgehende, sich verästelnde Kanäle. Dasselbe fand er in alten Knochen aus der Sekundärzeit, dagegen fehlten dieselben in frischen und alten Knochen der Jetztzeit. Roux fasst diese abnormen Kanäle als Produkte von Mikroorganismen auf und zwar von einem im Meerwasser lebenden, noch unbekannten Pilze, den er Mycelites ossifragus nennt.

C) **Das Färben der Schnitte.** Vorfärbungen der gehärteten Stücke in toto sind wegen der zu ungleichmässigen Beschaffenheit pathologisch veränderter Organe fast nie zu gebraucheu, sondern jeder Schnitt muss für sich behandelt werden. Nach dem Schneiden der Gewebe werden bei allen Methoden die Schnitte schliesslich in absolutem Alkohol entwässert. Macht man in den früher angegebenen Weisen Kernvorfärbungen dieser Schnitte, indem man dieselben direkt aus Alkohol in die Farben bringt oder indem man sie aus Alkohol erst in Wasser und von hier in die Farben bringt, so werden die gefärbten Schnitte in Wasser ausgewaschen und dann in

1) Comptes rendus 1879, Bd. 89, S. 1102.

2) Zeitschrift f. wissenschaftl. Zoologie 1887, Bd. 45, S. 227.

Alkohol übertragen. Sowohl die ganz ungefärbten, als die durch die Härtungsmittel (Chromsäure, Pikrinsäure) angefärbten, als die direkt mit Kern- und Protoplasmavorfärbungen versehenen Schnitte liegen demnach stets in absolutem Alkohol, wenn wir zur Bakterienfärbung schreiten. Für blaue und violette Bakterienfärbung wählt man zur Kern- resp. zur Kern- und Protoplasmavorfärbung Karmin, für rothe Bakterienfärbung Hämatoxylin oder Kernschwarz. Die Bakterienfärbung selbst kann nun a) ganz auf nassem Wege erfolgen, oder b) die Präparate werden schliesslich als Trockenpräparate behandelt.

Zu jedem dieser Verfahren stellt man die erforderlichen Reagentien, Farben-, Differenzirungs-, Entwässerungs-, Nachfärbe-, Aufhellungs- und Einschlussmittel in bequemen Gläsern, Krystallisationsschalen, Uhrgläsern oder am besten wohl in hohl geschliffenen Glasklötzchen in der richtigen Reihenfolge vor sich hin. Zum Abtupfen legt man vorher zurechtgeschnittene Stückchen Fliesspapier zur Hand.

Die Uebertragungen von einer Flüssigkeit in eine andere können nunmehr in verschiedener Weise erfolgen. Jeder Forscher macht sich allmählich seine eigene kleine Technik, so dass es schwer ist zu sagen, welche die beste ist. Man könnte vielleicht 3 Verfahren unterscheiden.

1. Alle Uebertragungen von der ersten bis zur letzten werden mit einem Spatel gemacht. Man breitet mit Hülfe von Glas-, Stahl- oder Platinnadeln den zum Flottiren gebrachten Schnitt in der Flüssigkeit ganz flach auf den Spatel, hebt diesen dann mit dem Schnitte heraus, saugt und tupft die überschüssige Flüssigkeit mit Fliesspapier ab und senkt den Spatel mit dem Schnitt in die folgende Lösung. Es ist ein für alle Mal zu bemerken, dass Uebertragungen in wässrige und ölige Lösungen auch direct mit einer Nadel geschehen können, weil sich die Schnitte in denselben immer ausbreiten lassen, dass die Uebertragungen in Alkohol stets mit auf dem Spatel (oder anderweitig) glatt ausgebreitetem Schnitte oder mit einer dasselbe leistenden Methode erfolgen müssen, um das Entstehen von Falten zu vermeiden.

2. H. Kühne macht die ersten Uebertragungen mit Glasnadeln, fängt schliesslich den differenzirten Schnitt in dem zum Aufhellen verwendeten Xylol mit Hülfe einer über die Fläche gebogenen Pinzette mit einem untergeschobenen Deckgläschen (statt des Spatels) auf, hebt ihn mit dem Deckglase aus dem Xylol, lässt das Xylol ablaufen, dreht das Deckgläschen nunmehr mit dem Schnitte nach unten und lässt es so auf den Balsamtropfen auffallen, den er vorher auf den Objectträger gegeben hat.
3. Nach Weigert bringt man oft bequem den vorbereiteten Schnitt direct aus dem Alkohol auf den Objectträger und nimmt die Färbung, Entfärbung etc. unmittelbar auf der Stelle vor, auf die beim Einbetten der Schnitt endgültig zu liegen kommt. In diesem Falle muss das Entfernen der Lösungen mit Fliesspapier sehr genau vorgenommen werden.

Anfänger thun gut, sich zunächst auf eine bestimmte Technik einzuarbeiten. Zur Orientirung diene folgendes Schema für die einfache Schnittfärbung.

1. der Schnitt liegt in Alkohol [Ev. nach vorausgegangener Kernfärbung].
2. Einlegen in dest. Wasser ca. 1 Minute.
3. Färbung 5 Minuten (bis zu 24 Stunden). Bei alkoholischen Farb-Lösungen direct aus 1 in 3 mit Umgehung von 2.
4. Abspülen des überschüssigen Farbstoffes durch Einlegen in destillirtes Wasser bis zu 5 Minuten;
5. Differenzirung durch verd. Essig- oder Salzsäure bis zu 1 Minute;
6. Entfernen der Säure durch
   a) kurzes Einlegen in verdünnte Lösung von kohlensaurem Lithion und dann (ev. mit Uebergehen von a nur)
   b) destillirtes Wasser einige Minuten.
7. Entwässern zur Nachbehandlung und zum Conserviren.

A. Mit Alkohol:

a) absoluter Alkohol, in dem eine Spur der ad 3) dienenden Farbe aufgelöst ist;
b) reiner absoluter Alkohol momentan. [Hier wird ev. die Doppel- oder Nachfärbung eingefügt.]

8. Aufhellen in ätherischen Oelen: a) Tereben, dann folgt b) Xylol (ev. direct, ohne a, in Xlyol), welches ev. gewechselt wird. [Bei Methode 1 und 2 folgt jetzt das Uebertragen auf den Objectträger mit Spatel oder Deckglas.]
9. Absaugen des überschüssigen Xylols mit Fliesspapier
10. Aufbringen eines Tropfens Balsam
11. Auflegen des Deckglases
12. Ev. leichtes Anwärmen des Objectträgers zum besseren Ausbreiten des Balsams unter dem Deckglase

B. Mit Anilinöl:

1 bis 6 wie oben.
7. a) Anilinöl, in dem etwas von der Farbe 3) aufgelöst ist;
b) reines Anilinöl zum Abspülen des Schnittes.
8 bis 12 wie bei A.

Die Färbung kann zunächst die Aufgabe verfolgen, die Bakterien oder andere Mikroorganismen sicher und möglichst zahlreich in allen Fällen nachzuweisen, ohne ängstliche Rücksicht auf histologische Fragen. Derartige Methoden hat man auch als „Universalmethoden" bezeichnet.

a) Universalmethoden für Methylenblau, den am vielseitigsten verwerthbaren Farbstoff.

1. Methode von Löffler. Als Farblösung dient eine Mischung aus 30 ccm einer concentrirten alkoholischen Methylenblaulösung und 100 ccm einer Kaliumhydratlösung von 1:10000 Wasser. In dieser Lösung bleiben die Schnitte einige Minuten, dann werden sie in einer 0,5 % Essigsäurelösung einige Secunden hin und her bewegt, dann in absolutem Alkohol gut entwässert, in Cedernöl aufgehellt und in Balsam eingeschlossen.

Später hat Löffler zum Differenziren der Bakterien und Kerne statt der 0,5 % Essigsäure eine 1 % Essigsäure ge-

nommen, „welcher man durch Tropaeolin 00 in wässriger Lösung eine etwa rheinweingelbe Farbe gegeben hat“.

Noch besser finde ich es, wenn man den durch Essigsäure oder Essigsäure-Tropaeolin differenzirten Schnitt in schwach alkalischem Wasser (verdünntes kohlensaures Lithion) abspült, ihn dann in reines Wasser und darauf in absoluten Alkohol überträgt, dem nach Kühne durch Zusatz einiger Tropfen von alkoholischem Methylenblau eine schwach blaue Färbung ertheilt ist. Dieser gefärbte Alkohol entwässert, aber bewirkt keine nachträgliche Entfärbung der Kerne und Bakterien. Der so entwässerte Schnitt wird dann einen Moment in reinem absolutem Alkohol abgespült, darauf in Tereben, dann in Xylol und dann in Balsam übertragen.

2. Methode von H. Kühne. Färbung in Karbol-Methylenblau bis zu 30 Minuten, Abspülen in Wasser. Dann wird der Schnitt in angesäuertem Wasser (10 Tropfen Salzsäure zu 500 Wasser) bis zur blassblauen Färbung ausgezogen, darauf in verdünntem kohlensaurem Lithion (6 bis 8 Tropfen der concentrirten wässrigen Lösung zu 10 ccm Wasser) abgespült und in reines Wasser übertragen, in dem er einige Minuten bleibt. Dann wird er auf einem Deckglase durch Andrücken von Fliesspapier von seinem Wasser befreit oder er wird einen Moment in absoluten Alkohol getaucht, um dem Schnitte so viel Wasser zu entziehen, um ihn auf Oel ausbreiten zu können und nun wird der Schnitt in Methylenblau-Anilinöl übertragen. Anilinöl entwässert den Schnitt, ohne ihm in Folge seines geringen Zusatzes von Methylenblau die Farbe nachträglich aus Kernen und Bakterien entziehen zu können. Nach dem Entwässern wird der Schnitt in reinem Anilinöl abgespült, dann zwei Minuten zur Entziehung des Anilinöls und zum Aufhellen in leicht flüssiges ätherisches Oel, wie Thymen oder Tereben, gebracht. Von hier kommt der Schnitt zur völligen Entölung in ein erstes und dann in ein zweites Schälchen mit Xylol und von hier in Balsam.

b) Universalmethode für Pararosaniline, besonders für die violetten Farben, von denen Krystallviolett am meisten zu

empfehlen ist. Auch Viktoriablau scheint ganz ebenso zu wirken. H. Kühne verwendet diese Farben in verdünnten alkoholischen Lösungen (S. 108); beide sind aber auch sehr gut mit Karbolsäure als Beize zu verwenden und Violett verträgt auch Anilinwasser gut.

Nach Gram kommen die Schnitte aus der Farbe direct in Jod-Jodkaliumlösung, in der sie 1 bis 3 Minuten bleiben. In dieser Lösung tritt ein Niederschlag ein und die Schnitte werden schwarz-purpurroth gefärbt. Dann kommen dieselben in Alkohol bis zur vollständigen Entfärbung, die Aufhellung geschieht wieder wie oben, d. h. entweder

α) nach Gram selbst; hierbei folgt auf den Alkohol Oel, dann Balsam oder

β) in der verbesserten Weise, dass auf den Alkohol Tereben, Xylol und dann erst der Einschluss in Balsam erfolgt oder

γ) nach Weigert. Die Schnitte kommen aus dem Jod-Jodkalium sofort in eine einige Male zu wechselnde Mischung von 2 Anilinöl und 1 Xylol, in welcher (statt in Alkohol) die Differenzirung und die Entwässerung erfolgt, dann folgen reines Xylol und Balsam oder

δ) nach H. Kühne. Derselbe spült die Schnitte aus der Jod-Jodkalilösung einen Moment in Wasser ab, taucht sie dann in Alkohol eben ein und lässt nun das Gemisch aus Anilinöl und Xylol zum Differenziren und Entwässern einwirken; dann folgen reines Xylol und Balsam.

Andere Verbesserungen der Gram'schen Methode, welche bei Verwendung von reinem Alkohol öfters Niederschläge zeigt, bestehen darin, dass man die Schnitte nach der Jod-Jodkaliumlösung nach Gram und Günther in Alkohol bringt, welcher 3 $^0/_0$ Salz- oder Salpetersäure enthält. Nach Ribbert hat sich statt dessen ein Zusatz von 10 bis 20 Theilen Essigsäure zum Alkohol bewährt, dann folgt Abspülen in reinem Alkohol und sonst die obige Behandlung. Rauchende Salpetersäure nach Lutz möchte ich weniger empfehlen. Auch die Methode von Unna bietet keine praktischen Vortheile. Unna verwendet statt der Jod-Jodkaliumlösung von Gram, wie früher dargelegt,

eine concentrirte Lösung von Jodkalium und Wasserstoffsuperoxyd. Die weitere Behandlung ist dieselbe wie bei Gram selbst.

Diese Methode ist leider nicht so universell wie die Methylenblaumethode, weil ziemlich viele pathogene Bakterien dabei entfärbt werden. Hierdurch eignet sie sich oft zur Differentialdiagnose (cf. S. 121). Sie hat, wo sie anwendbar ist, den grossen Vortheil, isolirte Bakterienfärbungen zu liefern, während bei Methylenblau Kerne und Bakterien gefärbt werden.

c) Universalmethoden für Fuchsin und andere basische Anilinfarben existiren bis jetzt nicht in so ausgesprochener Weise. Dies dürfte aber wohl daran liegen, dass man die Entfärbungen mit Salzen noch nicht genügend durchprobirt hat. Färbt man mit Beizen, besonders Karbolsäure, so kann man nach Koch die gefärbten Schnitte in eine Lösung von kohlensaurem Kali bringen, welche man sich derart herstellt, dass man eine gesättigte Lösung dieses Salzes mit gleichen Theilen destillirtem Wasser verdünnt. In dieser Lösung bleiben die Schnitte ca. 5 Minuten, werden dann in Alkohol entwässert, dem man von einer alkoholischen Lösung der ursprünglichen Farbe so viel zusetzt, dass der Alkohol nicht entfärben, sondern nur entwässern kann. Darauf folgt momentanes Abspülen in reinem Alkohol, dann Tereben, Xylol, Balsam. Vielleicht könnte man auch hier statt der Alkohol-Entwässerung die Entwässerung mit Anilinöl versuchen, dem von der ursprünglichen Farbe zugesetzt ist, dann reines Anilinöl, Tereben, Xylol, Balsam.

d) Die Säurefestigkeit der Tuberkelbacillen als Ausgangspunkt für eine neue Universalmethode.

Die Tuberkelbacillen widerstehen, wie schon erwähnt und wie für Schnitte noch später speciell dargelegt wird, nach eingetretener Färbung einem Entfärben mit starken Mineralsäuren. Zuerst hat Spina versucht, auch andere Bakterien durch Tanninbeize ebenso säurefest zu machen, und dies war ihm an Deckglaspräparaten auch gelungen. Es dürfte sich wohl empfehlen, diesen Weg auch für Schnittpräparate zu versuchen. H. Kühne hat etwas ähnliches durch Verwendung

von Anilinfarben erreicht, wenn er die mit Karbol-Methylenblau gefärbten Schnitte statt mit angesäuertem Wasser zu differenziren, mit stark verdünnten wässrigen Lösungen von Chlorhydrinblau auszog. 10 ccm der käuflichen saueren Lösung dieses basischen(?) Indulin werden mit 10 Alkohol und 90 Wasser versetzt; hiervon wird so viel in ein Schälchen mit Wasser gegeben, dass es noch eben durchsichtig ist. Wurden nun die mit Karbol-Methylenblau gefärbten Schnitte mit dieser Chlorhydrinlösung behandelt, so konnten Milzbrandbacillenschnitte 36 Stunden in Alkohol gelegt werden, ohne dass Entfärbung der Bacillen eintrat. Aehnlich wirkte das Chlorhydrinblau auf Mäuseseptikaemiebacillen, wenn die Schnitte vorher mit Karbolauramin gefärbt waren.

Eine ähnliche, vielleicht noch kräftigere Wirkung hat Schwarzbraun, aber in Form der Vorfärbung. Während mit Karbolfuchsin gefärbte Tuberkelbacillen durch Fluoresceïn-Alkohol differenzirt, aber nicht entfärbt werden, werden die anderen Bakterien hierdurch fast alle schnell entfärbt. Färbt man aber Schnitte von Milzbrandbacillen 5 Minuten in Karbol-Schwarzbraun, spült in Lithionwasser ab, entwässert in Alkohol und färbt erst darauf 5 Minuten in Karbol-Fuchsin, so widerstehen diese roth gefärbten Milzbrandbacillen jetzt starken Mineralsäuren etwas und man kann sie sehr energisch mit Fluoresceïn-Alkohol differenziren, ohne sie zu entfärben.

Reine isolirte Färbungen der Bakterien liefern von diesen Universalmethoden die Gram'sche Jod-Pararosanilinmethode und die Koch'sche Salzmethode. Doppel- und mehrfache Färbungen lassen sich bei den Universalmethoden erzielen:

a) durch die vorausgegangene Härtung mit Chromsäure oder Pikrinsäure als Protoplasmafärbungen;

b) durch Vorfärbung der Kerne. Hierbei liegen die Schnitte (cf. Karmin und Hämatoxylin S. 99) schliesslich in Alkohol, so dass bei a und b die Färbung nach Schema S. 173 erfolgt.

c) Bei der Jod- und Salzmethode macht man differente Kernfärbungen entweder ebenfalls durch Kernvorfärbung oder durch

Nachfärbung der entfärbten Kerne. Im letzteren Falle bringt man die Schnitte bei der Alkoholbehandlung der ersten Färbung aus dem reinen Alkohol (Schema A; S. 173 No. 7, b) in wässrige Lösungen einer Contrastfarbe, z. B. Vesuvin, Auramin, Methylgrün. Man differenzirt diese zweite Farbe aber nicht durch Säure, sondern nur durch reinen absoluten Alkohol, sodass derselbe Zustand wie nach 7, b wieder hergestellt ist, dann folgen Aufhellen etc. wie bei Schema No. 8—12. Bei der Anilinöl-Entwässerung kommen die Schnitte aus dem reinen Anilinöl (Schema B; No. 7, b) in eine Contrastfarbe, z. B. Safranin, Auramin, Eosin, Fluoresceïn, welche in Anilinöl aufgelöst ist, dann folgt wieder reines Anilinöl, sodass derselbe Zustand wie nach 7, b wieder hergestellt ist, darauf Tereben, Xylol, Balsam wie No. 8—12.

Trockenpräparate wurden auch früher schon gelegentlich angefertigt. A. Pfeiffer[1]) hat für feine Gewebe, wie Omentum kleiner Thiere, Pia mater, statt der Härtung in Alkohol eine Behandlung derartiger Gewebe nach Art der Deckglastrockenpräparate mit Erfolg angewendet. Unter Wasser wird ein Stückchen Omentum oder Pia auf einem Deckglase ausgebreitet, darauf wird das Deckgläschen vorsichtig aus der Flüssigkeit gehoben, so dass keine Faltung eintritt; dann wird das überschüssige Wasser mit Fliesspapier abgesaugt und auf zwei gegenüberstehenden Stellen des Deckgläschens das Gewebe etwas über den Rand gelegt. Das überstehende Stückchen schlägt sich über den Rand und fixirt so das Gewebe faltenlos. Das Ganze wird dann durch etwa einhalbstündiges Erwärmen bei 40 bis 50° ohne Faltung an das Deckglas angetrocknet, dann fixirt, indem es dreimal durch die Flamme gezogen wird, und wie ein Deckglaspräparat gefärbt.

Systematisch wurde das Antrocknen aber erst von Unna[2]) angewendet, um das bei der Alkohol-Oelmethode sich bisweilen einstellende nachträgliche Entfärben ganz auszuschliessen. Speciell zum

[1]) Mittheilungen aus der amtlichen Lebensmittel-Untersuchungs-Anstalt zu Wiesbaden, 1885, S. 199.

[2]) Monatshefte f. praktische Dermatologie. Ergänzungsheft 1885, S. 47.

Nachweise der Leprabacillen werden die mit Anilinwasserfuchsin gefärbten Schnitte in 10 bis 20 % wässriger Salpetersäure bis zur Annahme einer gelben Farbe differenzirt. Dann kommen sie bis zur Wiederkehr der Rothfärbung der Schnitte einige Secunden in Spiritus dilutus. Das Auswaschen der Säure geschieht entweder durch längeres Verweilen in destillirtem Wasser oder durch einen Spülapparat oder durch abwechselndes kurzes Eintauchen in absoluten Alkohol und dest. Wasser oder durch einmaliges Eintauchen in schwaches Ammoniakwasser. Darauf werden die Schnitte auf den Objectträger gebracht, das überschüssige Wasser wird mit Fliesspapier abgetupft und dann werden die Schnitte vorsichtig über der Flamme 1 bis 2 Minuten bis zur absoluten Trockenheit erhitzt. Der Einschluss erfolgt dann unmittelbar in chloroform- und ölfreiem Balsam. Da der Schnitt beim Antrocknen die schmelzenden Fetttheilchen des Gewebes einsaugt, wird er nach Unna „gebraten".

Dieser Eingriff ist für die Integrität der histologischen Structur aber sehr schwer, wie Touton[1]) am selben Lepramaterial einwandsfrei nachgewiesen hat, und es muss das „Braten" durch das schonendere, aber langsamere Antrocknen an der Luft oder im Exsiccator ersetzt werden. Die Ansicht von Unna, dass das Eintrocknen die thierischen Gewebe nicht mehr und nicht weniger schädige als die Bakterien, ist nicht richtig, weil die protoplasmareichen, weichen grossen Zellen viel leichter zu verändern sind als die mit derben Membranen ausgestatteten Bakterien, bei denen wegen dieses Umstandes und bei ihrer Kleinheit Veränderungen viel weniger auffallen. Die Trockenmethode verkleinert aber nach Unna die Tiefendimension, die Dicke des Schnittes und rückt dadurch alle im Schnitte befindlichen Bakterien mehr in eine Ebene. In Folge dessen sieht man in Trockenpräparaten Bakterien leichter und in grösseren Mengen als bei den Oelmethoden und deshalb ist die Trockenmethode zum einfachen Nachweise von Bakterien im Gewebe vorzüglich geeignet und hat sich grosser Verbreitung zu erfreuen. Zu feineren histologischen Studien ist sie aber nicht brauchbar.

---

[1]) Fortschritte der Medicin 1886, Bd. IV, No. 2.

Kühne verwendet die Trockenmethode derart, dass er die in der früher geschilderten Weise differenzirten Schnitte im Wasser auf einem Deckgläschen auffängt, das Wasser absaugt und durch einen Luftstrom, welcher mittelst eines Handgebläses aus einer feinen Glasspitze senkrecht auf den Schnitt gerichtet wird, den Schnitt von den gröberen Wassermengen befreit. Das Deckgläschen wird nunmehr mit der Präparatenseite nach oben liegend auf eine Glasplatte gelegt, welche leicht auf 30° erwärmt gehalten wird. Ist der Schnitt durchscheinend glasig geworden, so wird das Erwärmen noch 5 Minuten fortgesetzt. Dann wird das Deckgläschen mit angetrocknetem Schnitt in ein Schälchen mit ätherischem Oel und von da in Xylol und Balsam gebracht.

Für einzelne pathogene Bakterien ist noch folgendes zu merken: Bei Rotzbacillen werden die Schnitte nach Kühne[1]) aus dem Alkohol erst in Wasser und aus diesem 3 bis 4 Minuten in Karbol-Methylenblau gebracht, worin sie eine blassblaue Farbe annehmen. Dann werden die Schnitte gut in Wasser ausgespült und nun zum einfachen Bacillennachweise wie oben als Trockenpräparate behandelt oder sie werden einen Moment in Alkohol getaucht (bei Behandeln auf Deckglas statt dessen Abtupfen mit Fliesspapier) und 5 bis 10 Minuten in Anilinöl entwässert, dem auf ein Blockschälchen 6 bis 8 Tropfen Terpentinöl zugesetzt sind, darauf folgt reines Terpentinöl, Xylol, Balsam. Bei Abdominaltyphus werden die Schnitte nach Kühne erst einige Minuten in conc. wässriger Oxalsäurelösung gebeizt, abgespült und dann in Methylenblau gefärbt, welchem 1 % Ammon. carbon. als Beize dient. Ebenso gut sind die anderen Methylenblau-Methoden. Bei Färbung mit wässrigem oder Karbol- oder Anilin-Fuchsin differenzirt man nach der Salzmethode mit 1 % Sublimatlösung. Cholera- und Recurrensspirochaeten werden in Schnitten gut durch die Methylenblau-Methoden dargestellt; beim Differenziren sind jedoch Säuren ganz zu vermeiden.

Zum Nachweis der Tuberkelbacillen dient a) die Methode von Ehrlich, Weigert, Koch (S. 126). Die Schnitte bleiben 12 bis 20 Stunden in der Kälte (durch Erwärmen auf eine Stunde

---

[1]) Fortschritte der Medicin 1888, No. 22.

abzukürzen) in Anilinwasser-Violett (resp. Fuchsin); darauf werden sie einige Secunden in ca. 25 % Salpeter-, Schwefel- oder Salzsäure, dann einige Minuten in 60 % Alkohol abgespült. Darauf Nachfärben in verdünnter wässriger Lösung von Vesuvin (resp. Methylenblau), Spülen in 60 % Alkohol, Entwässern in absolutem Alkohol, Aufhellen in Cedernöl und Einlegen in Balsam. Für Schnitte ziehe ich b) die in der Kälte schon in 10 bis 15 Minuten gut färbende Ziehl-Neelsen'sche Methode mit Karbolsäure als Beize vor; die Differenzirung kann mit Schwefelsäure, eventuell aber auch mit Salz- oder Salpetersäure erfolgen. Sonst ist die Methode wie die vorausgenannte.

Von den verschiedenen Modificationen der Koch'schen und Ziehl'schen Methode, welche Kühne angegeben hat, will ich nur eine anführen. Mit verdünntem Kernschwarz (1 bis 4 Theile Wasser zu einem Theil Kernschwarz) werden die Schnitte vorgefärbt, bis sie einen dunkelgrauen Ton angenommen haben. Abspülen in verdünnter Lösung von kohlensauerem Lithion, bis der Schnitt hellgrau aussieht. Abspülen in reinem Wasser, 5 Minuten Entwässern in Alkohol. Darauf 10 Minuten Färben in Karbolfuchsin, Abspülen in Wasser, Differenziren in Fluoresceïn-Alkohol, Auswaschen in reinem Alkohol, dann 5 bis 10 Minuten Methylgrün-Anilinöl (2 Tropfen der concentrirten Lösung auf ein Schälchen reines Anilinöl). Darauf reines Anilinöl, Tereben, Xylol und Balsam.

Für Leprabacillen empfehlen sich dieselben Färbungen. Wegen der Differentialdiagnose verweise ich auf das früher Gesagte (S. 131). Man muss zu diesem Zweck die Schnitte ohne Beizen anfärben, weil sich die Leprabacillen schon dann schnell färben. In Methylenblau färben sich die Tuberkelbacillen mit Karbolsäure als Beize schon innerhalb einer halben Stunde, die Leprabacillen aber nicht unter einer bis zwei Stunden und im Vergleich mit Karbolsäure-Fuchsin noch sehr ungenügend.

Für Syphilisbacillen gilt gleichfalls das früher Gesagte und sie werden entweder nach Lustgarten gerade so wie die Deckglaspräparate behandelt oder man spült die gefärbten Schnitte mit Wasser ab, differenzirt sie in verdünnter Lösung von liquor ferri nach de Giacomi und Gottstein, entwässert in Alkohol. Die

fuchsingefärbten Schnitte sind dann gleichmässig hellviolett, die Kerne entfärbt und die Bakterien roth bis dunkelviolett; bei Violettfärbung sind die Bacillen schwarzblau. Doutrelepont und Schütz färben 24 bis 48 Stunden in 1 % wässriger Lösung von Violett. Zum Entfärben werden die Schnitte einige Sekunden in verdünnter Salpetersäure (1 : 15) hin- und herbewegt und dann 5 bis 10 Minuten in 60 % Alkohol gebracht. Blassveilchenblau kommen sie dann einige Minuten in eine schwache, durchsichtige, wässrige Lösung von Safranin. Die dann intensiv roth gefärbten Schnitte werden einige Sekunden in 60 % und nur einen Moment in absolutem Alkohol abgespült und entwässert, in Cedernöl aufgehellt und in Balsam eingeschlossen. Die Bacillen sind blau, die Kerne und das Gewebe hellroth, die Mastzellen blau mit rothem Kern. Fordyce[1]) färbt 12 Stunden in Krystallviolett nach Kühne (1 zu 10 Alkohol und 90 Wasser).

Die übrigen Bakterien werden nach der Methylenblau- und resp. nach der Gram'schen Methode gefärbt. Ueber die wichtigsten Arten, welche dabei gefärbt bleiben resp. sich entfärben cf. S. 121.

Nach Sahli gewährt die Lösung von Methylenblau in Borax (S. 111) für den Nachweis von Bakterien im **Centralnervensystem** den Vortheil, dass einmal die Bakterien sich so gut färben wie mit der alkalischen Methylenblaulösung und dass gleichzeitig eine sehr feine Differenzirung der verschiedenen Elemente des Nervensystems eintritt, indem die Gliakerne blau erscheinen, die Fasern deutlich und scharf blau hervortreten und die Ganglienzellen blass grünlich werden. Die Schnitte kommen 10 Minuten bis mehrere Stunden, ohne Ueberfärbung befürchten zu müssen, in die blaue Lösung, werden dann abgespült und darauf so lange in Wasser oder Alkohol differenzirt, bis die graue Substanz sich hell von der tiefblauen weissen abhebt dann folgt Cedernöl und endlich Balsam. Eine weitere Differenzirung wird möglich durch secundäre Einwirkung anderer Farben, besonders sauerer Anilinfarben, Säurefuchsin, Tropäolin, vielleicht auch Eosin, ferner von Pikrinsäure.

---

[1]) Centralblatt f. Bakteriologie 1889, V, No 6 (Referat).

Für die letztgenannten Methoden und einige ältere Vorschriften darf ganz allgemein gesagt werden, dass sie noch befriedigender ausfallen, wenn man beim Differenziren und Entwässern dem Alkohol oder Anilinöl principiell eine geringe Menge von der Farbe zusetzt, in der die Färbung erfolgte, damit diese Mittel nur entwässern, aber nicht entfärben. Ebenso sollte die Aufhellung und Entölung in der angegebenen, etwas umständlicheren, aber doch nicht unbequemen Weise durch Tereben und Xylol erfolgen.

Zur Beantwortung der pathologisch-histologischen Fragen über die Beziehungen der Bakterien zu den Zellen ist die Färbung der Bakterien nur ebenso wichtig wie die Darstellung der Kerne, Kerntheilungsfiguren und des Protoplasma. Die Darstellung dieser Gebilde in natürlicher Lage erfordert grösste Vorsicht in der Wahl der Fixirungs-, Härtungs- und Einbettungsmethode. In dieser Hinsicht sind in Zukunft die Härtungen in Chromsäure, Sublimat, Pikrinsäure und in den angegebenen Gemischen und von den Einbettungen vor Allem die Celloidineinbettung mehr zu beachten als es bis jetzt Regel war.

Wenn auch in methodischer Hinsicht für die endermatischen Bakterien keine besonderen Technicismen gelten, so ist doch diesen Verhältnissen noch viel Aufmerksamkeit zu widmen. Manche derartige Heerde sind als secundäre Localisationen aufzufassen, z. B. bei Syphilis, zum Theil bei Tuberkulose, Lupus, Lepra, und bei anderen ist vielleicht eine vorausgegangene Wunde die Ursache für das Eindringen an dem befallenen Orte, wie man es für Erysipel geradezu als Dogma aufgestellt hat. Möglich ist es aber und zuerst von Garrè[1]) für die Entstehung von Karbunkeln und Furunkeln durch den sog. Staphylokokkus pyogenes aureus erwiesen, dass auch durch die unverletzte Haut, durch die Ausführungsgänge der Hautdrüsen Bakterien eindringen können.

Eine kurze Besprechung erfordern noch

die epiphytischen Bakterien

und die ähnlich zu beobachtenden übrigen epiphytischen Mikroorganismen. Ob sich unter den epiphytischen Bakterien parasitische

[1]) Fortschritte der Medicin 1885, S. 6.

befinden, ist bis jetzt nicht sicher entschieden. Die Hauptschwierigkeit dieser Untersuchungen liegt in der Anwesenheit von Fett.

Balzer[1]) wäscht die Hautschuppen mit Aether und Alkohol und untersucht dieselben nach dem Färben mit alkoholischer Eosinlösung oder ohne vorausgegangene Färbung in 40 %iger Kalilauge. Nach von Sehlen[2]) werden die Haare nach der Entfettung auf kurze Zeit in Alkohol gebracht, und kommen dann in eine dünne Anilin-Fuchsinlösung. Darauf werden dieselben mit salzsaurem Alkohol ausgewaschen, der Rest der Säure mit destillirtem Wasser entfernt, eine Doppelfärbung mit concentrirter wässriger Lösung von Gentianaviolett herbeigeführt, mit Alkohol differenzirt wie sonst.

Nach Bizzozero[3]) tupft man Deckgläser auf die Oberhaut, zieht dieselben dreimal durch die Flamme, entfettet mit Chloroform und färbt mit Fuchsin oder Gentianaviolett. Die Epidermisschuppen kommen zum Entfetten erst einige Stunden in Alkohol, darauf ein oder zwei Tage in Aether, dann wieder in Alkohol. Nach dem Entfetten stehen drei Wege offen:

1. Man bringt auf den Objectträger einen Tropfen, welcher aus gleicher Menge Wasser und Essigsäure besteht, oder einen Tropfen einer 10 %igen Aetzkalilösung. In diesem Tropfen lässt man ein entfettetes Epidermisschüppchen einige Minuten aufquellen, legt das Deckglas auf. Zum Conserviren der Essigsäurepräparate lässt man vom Rande her Glycerin zutreten.

2. In einem mit Methylenblau leicht gefärbten Glycerin wird ein Epidermisschüppchen mit Nadeln ausgebreitet. Dabei färben sich Pilze blau, während die Epidermis ungefärbt bleibt.

3. Auf ein Deckgläschen bringt man einen Tropfen 50 %iger Essigsäure und trägt die entfetteten Epidermisschuppen ein. Nach einer viertel Stunde oder mehr, wenn die Schuppen gut aufgequollen sind, werden dieselben mit Nadeln ausgebreitet, dann dampft man

---

1) Contribution à l'étude de l'erythème tricophytique. Arch. de Physiol. 3. sér. 1883, Bd. 1, S. 171.

2) Mikrokokken bei Area Celsi. Fortschritte der Medicin 1883, No. 23.

3) Ueber die Mikrophyten der normalen Oberhaut des Menschen. Virchow's Archiv 1884, Bd. 98, S. 441.

den Essig bei gelinder Wärme ab: man kann zu diesem Zwecke das mit Pinzette gefasste Deckglas hoch über einer Flamme hin und her bewegen. Nach dem Abdampfen wird das lufttrockene Präparat dreimal durch die Flammen gezogen und dann gefärbt, indem man einen Tropfen einer wässrigen Lösung von Methylviolett, Gentianaviolett, Vesuvin, Methylenblau oder einer verdünnten alkoholischen Lösung von Fuchsin 10 bis 30 Minuten einwirken lässt, dann wird sorgfältig ausgewaschen, getrocknet und in Balsam conservirt. Methylenblau wird von Bizzozero vorgezogen, weil es nur die Pilzelemente färbt; ich habe es am vortheilhaftesten gefunden, die starke alkalische Lösung von Methylenblau etwa 5 Minuten einwirken zu lassen. Mit dieser kleinen Modification scheint mir diese dritte Methode von Bizzozero zur Zeit für den Nachweiss epiphytischer Mikroorganismen ganz geeignet zu sein.

Kurz erwähnen will ich, dass bei ächter Mykose die Mycelfäden der **Schimmelpilze** in den Schnitten am besten durch die Universalmethoden für Methylenblau nachgewiesen werden. Der Nachweis des **Strahlenpilzes** in Gewebschnitten gelingt meist ohne besondere Präparation. Wegen häufiger Verkalkung der Aktinomycesdrusen wird es oft nöthig die Entkalkung vorauszuschicken resp. die Härtung in salzsäurehaltigem Alkohol und dann erst in absolutem Alkohol vorzunehmen. Die Färbung gelingt nach Weigert[1]), indem man die Schnitte eine Stunde in Orseille-Lösung bringt. Reine Orseille, welche zur Befreiung von Ammoniak längere Zeit an der Luft gelegen hat, wird nach Wedl in einem Gemisch von 20 ccm absolutem Alkohol, 5 ccm Essigsäure, 40 ccm destillirtem Wasser in solcher Menge gelöst, dass die Flüssigkeit dunkelroth, und nach dem Filtriren rubinroth erscheint. Nach dem Färben spült man die Schnitte mit Alkohol ab, bringt sie in 1 $^0/_0$ ige wässrige Lösung von Gentianaviolett, und behandelt sie nun wie bei der Bakterienfärbung. In diesen Schnitten sind die Kerne blauviolett, das Bindegewebe schwach orange, die inneren Parthien des Strahlenpilzes verwaschen blau, die Aussenparthien rubinroth gefärbt und oft durch eine farblose Zone von den centralen Parthien getrennt. Aehnlich ist die Färbung wenn man

[1]) Virchow's Archiv 1881, Bd. 84, S. 245.

statt Gentianaviolett Methylenblau nimmt; das Centrum wird verwaschen grünlichbau, die Peripherie bläulichroth. Bei der Gram-schen Methode und der 24stündigen Einwirkung der starken alkalischen Methylenblaulösung und Nachfärben der Schnitte mit Eosin bleibt das Centrum fast ungefärbt, der Rand wird nach Johne[1]) dunkel rosenroth. Vorfärbung der Kerne mit Karmin und Nachbehandlung der nach Gram gefärbten Schnitte mit Pikrinsäurelösung macht die Kerne roth, die Drusen gelblich, die Fäden blaugrün.

Nach neueren Beobachtungen dürfte sich für Schimmelpilze, Soorpilze, Aktinomykose die Gram'sche Methode ganz besonders in der von Weigert (S. 176) vorgeschlagenen Form empfehlen.

Zur Härtung der Gewebe, bei denen die Zellen möglichst wenig verändert werden sollen, und in denen amoeboide Parasiten nachgewiesen werden sollen, empfiehlt Brass[2]) $^1/_8$ bis $^1/_2$ $^0/_0$ige Chromsäurelösung, der später noch einige Tropfen concentrirter Chromsäurelösung zugesetzt werden. Nach einiger Zeit kommt das Präparat erst in 30 $^0/_0$ igen Alkohol und allmählich zur vollständigen Wasserentziehung in immer stärkeren, schliesslich in absoluten Alkohol. Auch die Mischung von Chromsäure, Platinchlorid und Essigsäure ist zum schonenden Härten zu verwenden, besonders, wenn man auf 100 gr etwa 4 bis 6 Tropfen 1 $^0/_0$ige Ueberosmiumsäure zufügt. Auch die anderen Härtungsmittel dürften zu versuchen sein, da amoeboide Organismen immer wichtiger werden, z. B. bei Malaria, Dysenterie und vielleicht auch bei den acuten Exanthemen des Menschen. Die Färbung erfolgt durch Borax- oder Ammoniakkarmin oder in Hämatoxylinlösung oder durch Methylenblau.

Es ist wichtig zu wissen, dass eine Anzahl Form-Elemente zu Verwechslungen mit Bakterien im Gewebe Veranlassung geben kann. Ueber die Blutelemente vergl. S. 137.

Eine Verwechslung mit Kokken können in Schnitten leicht die sogenannten **Mastzellen** herbeiführen. Es sind dies kugelige oder

---

[1]) Bericht über das Veterinärwesen im Königreich Sachsen für das Jahr 1884, S.-A. S. 29.

[2]) Die Methoden bei der Untersuchung thierischer Zellen. Zeitschrift f. wissenschaftl. Mikroskopie 1884, S. 39.

spindelförmige Zellen mit grobkörnigem Protoplasma, dessen Granulationen sich den basischen Anilinfarben gegenüber wie die meisten Kokken verhalten. Die Kerne dieser Zellen färben sich in der Regel nicht, so dass leicht der Anschein einer Kokkenkolonie entsteht, mit der dieselben schon oft verwechselt wurden.

Diese Granulationen zeigen nicht die Resistenz gegen Säuren und Alkalien und sind nie von so gleicher Grösse wie die Kokken; weiter sind sie durch den Ort ihres Vorkommens meist zu erkennen, da sie gewöhnlich der Gefässwand aufsitzen. Ein genaues Studium dieser Zellen ist höchst nothwendig und hierzu empfiehlt sich besonders das Ohr der weissen Mäuse. Eine definitive Entscheidung ist oft nur durch isolirte Bakterienfärbung zu erreichen, bei der die Mastzell-Granulationen ungefärbt bleiben.

Zur gleichzeitigen Färbung der meisten Kokken und der Mastzellen empfiehlt sich nach Ehrlich-Westphal folgende Lösung, welche auch die Unterscheidung anderer Bakterien von Kernen gestattet.

100 ccm Partsch-Grenacher'sches Karmin,
100 ccm Glycerin,
100 ccm conc. alkohol. Lösung von Dahlia,
20 ccm Eisessig.

In dieser Lösung bleiben die Schnitte 24 Stunden, dann kommen sie einige Minuten in Alkohol, darauf in Oel und dann in Balsam. In dieser Lösung nehmen die Kerne eine rothe, die Mastzell-Granulationen und die Bakterien eine blauviolette Farbe an.

Bei der Universal-Methylenblau-Methode haben die Mastzellen einen violetten Ton.

Ueber die Verwechslungsmöglichkeit von Stäbchen mit Fettsäure-Krystallen vergl. S. 127. Ueber die Verwechslung von Stäbchenbakterien mit ausgestrichenen Zellkernen cfr. S. 143.

Wigand hatte zur Beseitigung „jeden Zweifels an der spontanen Bakterienbildung im Protoplasma der Zellen" durch Anamorphose aus diesem Protoplasma angegeben, dass sich in den lebenden gesunden Zellen des Blattes von Trianea bogotensis und der Haare von Labiaten bewegliche Bakterien befinden. Diese beweglichen

Stäbchen sind aber nach de Barry nichts Anders als Krystalle von oxalsauerem Kalk.

Fädig ausgeschiedenes Fibrin hat schon oft zu Verwechslungen mit Fadenbakterien oder Pilzmycelien geführt. So haben noch kürzlich Roy, Brown und Sherrington Fibrinfäden in der Darmwand für die Choleraparasiten gehalten und diese Fibrinfäden sollten eine parasitische Chytridiacee darstellen. Solche Verwechslungen mahnen zur grössten Vorsicht und man muss oft zur Controlle auch andere, auf der Metallimprägnation beruhende Fibrinfärbungen zum Vergleiche heranziehen, z. B. die Weigert-Herxheimer'sche Methode [1]). Die in Celloidin fixirten Schnitte kommen in eine Lösung aus 1 ccm Hämatoxylin, 20 absol. Alkohol, 20 dest. Wasser und 1 ccm einer kalt gesättigten Lösung von kohlensaurem Lithion etwa 3 bis 5 Minuten. In einem Schälchen mit officineller Eisenchloridlösung bildet sich in 5 bis 20 Sekunden der Metall-Lack unter gleichzeitiger Entfärbung. Dann folgt gründliches Abspülen in Wasser, wobei die Schnitte Farbstoffwolken abgeben, Entwässern in Alkohol, Aufhellen in Nelkenöl (ev. Kreosot, Xylol), Einlegen in Xylol-Balsam. In der Regel reicht die Weigert'sche Verbesserung der Gram'schen Methode S. 176 aus, da bei derselben Fibrin und seine hyalinen Derivate exquisit blau werden, während die Mikroorganismen meist viel dunkler, oft fast schwarz aussehen.

Zum Studium der Morphologie der Bakterien ist öfters die Fixirung der beobachteten Bilder wünschenswerth. Bei der directen Beobachtung der Entwicklungsgeschichte kann man nur versuchen die wechselnden Eindrücke möglichst getreu zu skizziren. Bei fixirten Präparaten wird man sich öfters mit Zeichnungen begnügen können, welche mit einem der gebräuchlichen Zeichenapparate möglichst exact aufgenommen werden. Auf die Dauer wird man nur ungern auf die photographische Wiedergabe der Bilder verzichten, da sie allein Objectivität garantirt, wie es Koch eingehend dargelegt hat.[2])

---

[1]) Fortschritte der Medicin 1886, Bd. IV., No. 24.

[2]) Beiträge zur Biologie der Pflanzen, II., 3. Heft 1887, und Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte, I., 1881.

Die der Photographie gezogenen Grenzen der objectiven Beweisführung liegen darin, dass die Photographie immer nur eine mehr oder weniger beschränkte Stelle eines Präparates genau wiedergiebt und dass die Darstellung von der vorausgegangenen, die natürlichen Verhältnisse bei protoplasmatischen Gebilden immer etwas beeinträchtigenden Präparation abhängig ist. Im natürlichen Zustande kann man die Bakterien bisweilen direct photographiren, wie zuerst Koch für Milzbrand bewiesen hat, in der Regel ist dies unmöglich. Gerade diese theoretisch das höchste versprechenden natürlichen Photogramme bleiben aber in der Regel hinter unseren Erwartungen zurück. Ebensowenig kann die Photographie die einzelnen Phasen der Entwicklung fixiren. Diese Grenzen der Leistungen der „objectiven" Bilder der Photographie muss man bisweilen um so mehr beachten, als vielfach der Streit sich überhaupt gar nicht um die Existenz eines Formelementes, sondern um dessen Deutung dreht. Auf dieses „subjective" Moment hat auch die „objectiv" zeichnende Photographie nur einen geringen Einfluss. Die Technik der Photographie ist zudem noch immer sehr zeitraubend. Während man früher aber Mikrophotogramme nur mit braunen Farben befriedigend erhalten konnte, gelingt dies jetzt seit Einführung der isochromatischen Platten in die Mikrophotographie durch van Ermengem mit allen Farben. Man hat dadurch jetzt eine grössere Auswahl in den zum Photographiren geeigneten Präparaten, wodurch sich allmählich eine grössere Handlichkeit der Mikrophotographie anbahnen dürfte.

Zur Orientirung verweise ich auf die Handbücher der Photographie, von denen das Werk von Stein: Das Licht im Dienste wissenschaftlicher Forschung, 2. Aufl. 1884/85, im 2. Hefte 1884, unter dem Separattitel: Das Mikroskop und die mikroskopische Technik zum Zwecke photographischer Darstellung, besondere Rücksicht auf die Mikrophotographie nimmt und besonders auf die S. 45 und 47 angegebenen Werke und eine Besprechung der neueren Litteratur von Neuhauss im Centralblatt für Bakteriologie 1888, Bd. IV., No. 3 und 4; ferner noch Crookshank: Photography of Bacteria. 1887.

II. Die Experimentelle Technik.

1. Die Methoden der Sterilisation.[1])

Specielle Litteratur über die experimentelle Seite der Bakteriologie.

Die Methoden der Pasteur'schen Schule behandeln:

Duclaux: Encyclopédie chimique: Microbiologie. 1883.
Pasteur: Études sur la bière. 1876.
Miquel: Les organismes vivants de l'atmosphère. 1883.
Miquel: Annuaire de l'observatoire de Montsouris seit 1879.

Die besonderen Methoden von Koch behandeln:

Crookshank: An introduction to practical Bacteriology. 1886.
C. Fränkel: Grundriss der Bakterienkunde. 3. Aufl. 1890.
Huber und Becker: Die pathologisch-histologischen und bakteriologischen Untersuchungs-Methoden. 1886.
Johne: Ueber die Koch'schen Reinkulturen. 1885.
Koch: Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte I. 1881.
Löffler: Bericht über die allgemeine deutsche Ausstellung auf dem Gebiete der Hygiene und des Rettungswesens I. 1885.
Woodhead and Hare: Pathological Mycology. I. Methods. 1886.

Unter besonderer Hervorhebung der Koch'schen Methoden hatte ich selbst in der ersten Auflage dieses Handbuches, 1885, versucht, alle bis dahin bekannten Methoden kritisch zu verarbeiten. In der 3. Auflage 1886, habe ich die gesammten Methoden noch sorgfältiger berücksichtigt. Die Berechtigung dieser möglichst objectiven Auffassung, welche allen Bemühungen gerecht zu werden versucht, dürfte wohl unzweideutig daraus hervorgehen, dass nicht nur einige der schon vorgenannten Werke sich auf meine Darstellung wesent-

[1]) Zusammenfassende Darstellungen der Frage über Abiogenesis, Generatio spontanea finden sich bei Gscheidlen, Physiologische Methodik Heft 2, 1876 S. 274; Heft 4, 1879 S. 499, und bei Tyndall, Essays on the Floating-Matter of the air, second edition 1883.

lich stützen, sondern dass dieselbe auch für eine ganze Klasse inzwischen erschienener Hand- und Lehrbücher über Methodik in unverkennbarer Weise als Vorlage und Anhalt gedient hat:

Banti: Manuale di Batteriologia. 1885.
Biggs-Hueppe: The Methods of bacteriological Investigation. 1886.
Bordoni-Uffreduzzi: I Microparassiti. 1885.
Canestrini: Batteriologia. 1890.
van Ermengem, d'après Hueppe: Manuel technique de Microbiologie. 1887.
Garbini: Guida alla Batteriologia. 1886.
Günther: Einführung in das Studium der Bakteriologie. 1890.
Kramer: Die Bakteriologie in ihren Beziehungen zur Landwirthschaft. 1890.
Migula: Bakterienkunde für Landwirthe. 1890.
Im Russischen erschienen derartige Werke von Heydenreich und Schulgin.

Einen anders gestalteten Versuch, die Methoden etwas allgemeiner zu berücksichtigen, unternahm:

Salomonsen: Bakteriologisk Teknik. 2. Aufl. 1889.
Uebersetzt von Durand-Fardel: Technique élémentaire de bactériologie. 1891.

Die Reihe der wissenschaftlichen Versuche über diese Frage eröffnete Spalanzani.[1]) Er füllte Infuse organischer Substanzen in Flaschen, welche verkorkt und versiegelt und dann eine Stunde im Wasserbade gekocht wurden. Diese Versuche, die Grundlage der Appert'schen Conservirungsmethode, macht man jetzt nach Pasteur besser in Kolben, deren Hals ausgezogen und während des Kochens zugeschmolzen wird. Hin und wieder misslang wohl ein derartiger Versuch bei nur einstündiger Dauer des Kochens, aber der Haupteinwand blieb der, dass kein Sauerstoff zutreten konnte. Gay-Lussac hatte nämlich 1810 die Ansicht entwickelt, dass zur Einleitung der Gährungen Sauerstoffzutritt erforderlich sei.

Der nächste methodische Fortschritt bestand darin der Luft und damit dem Sauerstoff nach dem Kochen Zutritt zu verschaffen, aber einer Luft, welche so behandelt war, dass sie nichts Lebensfähiges enthalten konnte. Franz Schulze[2]) wandte einen Kolben an,

[1]) Physikalische und mathematische Abhandlungen 1769.

[2]) Vorläufige Mittheilung der Resultate einer experimentellen Beobachtung über Generatio aequivoca. Poggendorf's Annalen der Physik 1836, Bd. 39, S. 487.

welcher einen doppelt durchbohrten Kork trug, in dem zwei rechtwinklig gebogene Glasröhren sich befanden, die dicht unterhalb des Korkes endigten. Die fäulnissfähigen Infuse oder in Wasser suspendirten Substanzen wurden so lange auf dem Sandbade erwärmt, bis alle Theile die Temperatur des siedenden Wassers erreicht hatten. Dann wurde, während des Entweichens des Wasserdampfs, an jede der rechtwinkligen Glasröhren ein Liebig'scher Kugelapparat befestigt, von denen der eine mit concentrirter Schwefelsäure, der andere mit Kalilauge gefüllt war. Es wurde nun wiederholt durch Saugen an der Seite des Kaliapparates Luft durch den Kolben gesogen, welche aber vor Eintritt in den Kolben die Schwefelsäure passiren musste. Nun trat trotz Anwesenheit der Luft keine Fäulniss mehr ein, wohl aber in wenigen Tagen, wenn nach dem Kochen gewöhnliche Luft zutrat.

Schwan[1]) zeigte, dass es „nicht der Sauerstoff, wenigstens nicht allein der Sauerstoff der atmosphärischen Luft" sein kann, welcher Gährung und Fäulniss veranlasst, indem er die zutretende Luft durch eine leicht flüssige Metallmischung leitete, welche auf den Siedepunkt des Quecksilbers erwärmt war.

Um dem Einwande zu begegnen, dass hierbei die Luft chemisch alterirt sein könnte, liessen Schröder und von Dusch[2]) die Luft durch Baumwolle streichen, welche entweder in Röhren eingebracht war, die mit den rechtwinklig gebogenen Glasröhren verbunden wurden, oder sie stopften den Hals des Kolbens während des Kochens mit Baumwolle zu. Pasteur[3]) kochte die Infuse in langhalsigen Flaschen, deren Hals langausgezogen und in verchiedener Weise gekrümmt wurde, aber derart, dass das offene Ende nach unten stand. Nach dem kochen konnte die Luft unverändert, selbst unfiltrirt zutreten und doch trat keine Fäulniss ein.

---

[1]) Vorläufige Mittheilung, betreffend Versuche über die Weingährung und Fäulniss. Poggendorf's Annalen 1837, Bd. 41, S. 184.

[2]) Ueber Filtration der Luft in Beziehung auf Fäulniss und Gährung. Annalen der Chemie und Pharmacie 1854, Bd. 89, S. 232.

[3]) Mémoire sur les corpuscules organisés qui existent dans l'atmosphère. Annales de Chimie et de Physiques III. Ser. T. 64, 1862, S. 66, und kürzere Angaben Compt. rend. Bd. 48, 1859, S. 337, und ibid. Bd. 50, 1860 S. 849.

In der Milch gelang dagegen Pasteur[1]) das Verhüten der Zersetzungen sicher nur bei Steigerung der Temperatur auf 110 bis 112° bei ca. $1^1/_2$ atm. Druck. Die Unzulänglichkeit des Kochens ermittelte auch Schröder[2]) für einzelne Substanzen, welche er nur durch sehr anhaltendes Kochen oder durch Steigerung der Temperatur im Digestor bis ca. 2 Atm. sicher sterilisiren konnte.

Bei diesen ersten axacten Versuchen, welche den Grund zur jetzigen Sterilisationstechnik legten, war man etwas einseitig von der Ansicht ausgegangen, dass die Luft vorwiegend oder sogar allein Träger der Keime sei, welche Gährungen, Fäulniss, Krankheiten hervorbringen sollen. Besonders die Untersuchungen über die Zersetzungen der Milch[3]) hatten aber weiter ergeben, dass die Gefässe, in denen die Versuche gemacht werden, häufig Träger von Keimen sind, weil die gewöhnlichen Reinigungsmethoden zum Vernichten von Keimen nicht ausreichen. Ebenso hatten die Gährungsversuche gelehrt, besonders als man versuchte zersetzungsfähige Substanzen unzersetzt aufzufangen, dass die Manipulationen selbst mit den scheinbar reinsten Händen Keime übertragen. Dies war besonders von dem Schöpfer der aseptischen Wundbehandlungsmethode, Semmelweiss, auch für die Wundinfectionskrankheiten der Menschen, besonders für die Pueperalfieber in geradezu klassischer, seiner Zeit weit vorausgeeilter Weise bewiesen worden.

Der Sterilisationstechnik sind demnach eine ganze Reihe scheinbar heterogener Aufgaben gestellt. Aber nicht in der kritiklosen Häufung von derartigen Technicismen liegt das Geheimnis des Erfolges, wie man bei vielen Arbeiten über Abiogenesis, Zymasen, Anamorphose des Protoplasma manchmal glauben möchte, sondern ausschliesslich in der richtigen Würdigung des concreten Falles. Wer sich gegen die Luftinfection sorgfältig schützt und die Keime mit seinen Händen oder Instrumenten überträgt, oder wer die Flüssigkeiten sterilisirt und nicht auf den früheren Inhalt der Gefässe

[1]) De l'origine des ferments. Compt. rend. 1860. Bd. 50, S. 849.

[2]) Ueber Filtration der Luft in Beziehung auf Gährung, Fäulniss und Crystallisation. Annalen der Chemie und Pharmacie 1861, Bd. 117, S. 273.

[3]) Hueppe: Zur Geschichte der Milchsäuregährung, Mittheilungen aus dem K. Gesundheitsamte 1884, Bd. II, S. 309.

Rücksicht nimmt, muss Misserfolge erhalten, wo ein anderer mit viel einfacheren Mitteln Erfolge erzielt.

Reinigen und Sterilisiren der Hände. Auf direkten Untersuchungen beruhende Vorschriften, welche besonders die Aufgaben des Arztes im Auge hatten, wurden von Forster[1]), Gärtner und Plagge[2]), Kümmel[3]) und besonders sorgfältig von Fürbringer[4]) gegeben, an dessen Arbeiten sich Mittheilungen von Landsberg[5]), Roux und Reynès[6]) anschlossen. Danach ist folgendes zu beachten:

1. Die Nägel und die Unternagelräume werden zuerst auf trockenem Wege von dem sichtbaren Schmutze befreit. Es ist gut die Nägel nicht zu lang zu halten.
2. Darauf werden die Hände und besonders die Unternagelräume eine Minute lang mit Seife und warmem Wasser unter Vermittelung einer guten scharfen Bürste gründlich abgebürstet und darauf die Seife mit warmem Wasser abgespült.
3. Um die zur Desinfection unerlässliche Adhäsion zwischen Epidermis und antiseptischer Lösung zu bewerkstelligen, werden die Hände nunmehr in Aether abgewaschen und darauf folgt eine Minute lang ein Abwaschen in Alkohol, als einem Mittel, welches in Aether und den darauf folgenden Desinfectionsmitteln löslich ist. Nimmt man vorher Aether, so genügt selbst gewöhnlicher Brennspiritus. Fürbringer fand aber dann noch eine Vereinfachung, indem er den Aether ganz wegliess und sofort Alkohol für eine Minute nahm; nur muss man in diesem Falle 80 % Alkohol nehmen.
4. Darauf werden die Hände eine Minute in der zur Desinfection dienenden Flüssigkeit gründlich bearbeitet.

---

[1]) Archiv für Hygiene 1885, Bd III.

[2]) Archiv f. klin. Chirurgie 1885, Bd. 32, Heft 2.

[3]) Deutsche med. Wochenschrift 1885, No. 22.

[4]) Untersuchungen und Vorschriften über die Desinfection der Hände des des Arztes 1888; deutsche med. Wochenschrift 1888, No 48.

[5]) Deutsche med. Wochenschrift 1888, No. 7, 1889, No. 2.

[6]) Comptes rendus 1888, Bd. 107, S. 870.

5. Endlich wird für gewöhnliche ärztliche Zwecke das Desinfectionsmittel direkt mit frischem reinem Handtuche abgetrocknet oder man kann auch das Desinfectionsmittel mit abgekochtem Wasser abspülen und dann die Hände abtrocknen. Für besonders schwierige Fälle und wissenschaftliche Versuche empfehle ich aber das Desinfectionsmittel mit 80 bis 96 °/₀ Alkohol abzuspülen, den Alkohol mit Aether aufzunehmen und diesen einfach verdunsten zu lassen. In einem warmen Raume geht das sehr schnell und man vermeidet dadurch jede Möglichkeit einer nachträglichen Verunreinigung.

Welches Mittel soll man zum Desinficiren der Hände verwenden? Da bei diesem sorgfältigen Verfahren schon relativ schwache Mittel ausreichen, scheint die Auswahl gross zu sein, aber praktisch kann man sich sehr beschränken. Einige neuere, mit Geschäftsgeheimnissen umgebene Mittel, wie Creolin, Kresolin, entsprechen unserer übrigen, auf das Controllirbare und Sichere gerichteten Arbeitsweise zu wenig, als dass sie ernstlich bei wissenschaftlichen Arbeiten in Frage kommen könnten, um so mehr, als diese Seifen für Hände und Instrumente wenig angenehm sind.

Karbolsäure reicht in 3 °/₀ Lösung aus, aber ihre reizenden Eigenschaften sind den Meisten auf die Dauer unangenehm. Aseptol ist in 3 bis 5 °/₀ Lösungen ebenso wirksam, reizt die Haut nicht, wird aber im Grossen nicht zuverlässig genug geliefert. Wir verwenden deshalb das Sublimat, weil es schon in starker Verdünnung ausserordentlich wirksam ist und in diesen Verdünnungen auch nicht reizend oder ätzend wirkt. Die erforderliche Concentration ist 1 bis 2 p. M. Da Sublimat Eiweiss coagulirt, das Quecksilberalbuminat wegen seiner Unlöslichkeit in Wasser weniger wirksam ist und die weitere Wirkung der Sublimatlösung herabsetzt oder aufhebt, auch die Wirksamkeit der reinen Sublimatlösungen durch Bildung von Kalomel etwas abnimmt, wurde in den letzten Jahren empfohlen, das Sublimat in sauerer Lösung zu verwenden. Schütz (cf. Fürbringer) hatte die starken Mineralsäuren und Essigsäure, Ziegenspeck[1]) 0,5 gr Citronensäure pro Liter, La-

[1]) Centralblatt für Gynäkologie 1886, No. 34, 1887, No. 16.

place[1]) Salzsäure oder 0,5 p. M. Weinsäure, Bujwid[2]) gleichfalls Salzsäure empfohlen. Die Wirksamkeit dieser saueren Lösungen ist sehr gross. Maass, von Bergmann, Lister hatten als Praktiker aber schon vorher gerade genügend auf die saueren Eigenschaften des Sublimats, als die hauptsächlich reizwirkenden desselben, aufmerksam gemacht und Liebreich[3]), dann Lübbert und Schneider[4]) machten wieder auf die älteren Untersuchungen aufmerksam, nach denen sich derselbe Effect, aber unter Verminderung und Aufhebung der Reizwirkungen erreichen lässt, wenn man durch Zusatz von Kochsalz oder Chlorammon Doppelsalze bildet. Man wählt demnach für die Lösungen als Grundlage die indifferente Kochsalzlösung von 0,5 %, welcher die nöthige Menge Sublimat (meist genügt 1 p. M.) zugeseszt wird. Die Lösung erfolgt in sterilisirtem Wasser; bei Brunnenwasser, auf welches man in der ärztlichen Praxis angewiesen sein kann, muss man die Menge Sublimat etwas steigern, bis zu etwa 0,5 %. Neben Sublimat dürften sich noch die neuerdings hergestellten neutralen ca. 0,5 bis 1 % Lösungen von Kresol empfehlen, weil sie sehr kräftig desinficiren und nicht reizen oder ätzen.

Sterilisiren der Metallgegenstände. Bei Operationen und Sectionen werden die gebrauchten Metallgegenstände, Scheeren, Messer sofort in Gefässe mit 3 bis 5 % Karbolsäure oder noch besser in neutrale oder alkalische 1 % Kresollösungen gelegt. Nachdem sie einige Stunden darin gelegen, werden sie sorgfältig mit einer Bürste gereinigt, abgetrocknet, frisch geschliffen und ev. auch polirt. Die so vorbereiteten und ebenso die neuen Instrumente werden bei wissenschaftlichen Untersuchungen meist durch trockene Hitze sterilisirt. Dies kann geschehen, indem man dieselben a) direkt in einer Flamme stark, bis zum Glühen der Spitzen erhitzt und sie dann auf Glas- oder Metallbänken, durch eine übergestellte Glocke gegen Staub geschützt, abkühlen lässt. Hierbei leiden aber die

[1]) Deutsche med. Wochenschrift 1887, No. 40.
[2]) Centralblatt für Bakteriologie 1888, III, No. 3.
[3]) Therapeutische Monatshefte I, 1887, Heft I.
[4]) Centralblatt für Bakteriologie 1888, No. 11 und 12.

Instrumente ausserordentlich und man kann deshalb b) die Instrumente in besondere Behälter aus Kupfer- oder Eisenblech legen und sie mit diesen Behältern in einem Trockenschrank bei 150° sterilisiren.

Das gründliche mechanische Reinigen und Putzen der Intrumente ist schon die bessere Hälfte der Desinfection, weil die glatten Flächen zum Haften von Keimen nicht geneigt sind. Derartig vorbereitete Instrumente kann man auch c) wie besonders für die ärztliche Praxis von Davidsohn[1]) empfohlen wird, 5 Minuten im Wasserbade oder Dampfstrome kochen, wobei sie weniger leiden als durch das direkte Glühen. Nach dem Herausnehmen werden dieselben mit sterilisirtem Tuche abgetrocknet und gegen Staub geschützt, abgekühlt.

Der Trockenschrank oder Sterilisationsappart für heisse trockene Luft[2]) besteht in seiner einfachsten Form aus einem doppelwandigen Kasten von Eisenblech mit Kupferboden Fig. 8. Die Regelung der Temperatur erfolgt durch Thermometer, t, und Thermoregulator, r. In der neuesten Zeit bringt man meist auch eine Cirkulationsvorrichtung für die erhitzte Luft an, wodurch die nothwendige gleichmässige Erhitzung des Innenraumes erst gesichert wird. Den Innenraum kann man durch Einlagen von Blech oder Draht nach Bedarf abtheilen. Die Dimensionen richten sich nach dem Bedarf. Das Anwärmen von 10 bis 20 Minuten abgerechnet, beträgt die Zeit der Sterilisirung eine Stunde bei ca. 150° C.

Fig. 8.



Zum Erwärmen dieser und später zu besprechender Apparate dient meistens das Gas, doch hat man auch für genügende Petro-

---

1) Berl. klin. Wochenschrift 1888, No. 35.

2) Für manche Einzelheiten über diesen und die anderen Apparate sind auch die illustrirten Kataloge zu Rathe zu ziehen.

leumheizapparate[1]) Vorsorge getroffen. Je nach der Grösse der Apparate und der zu erzielenden Temperatur wählt man Heizkränze, Flammenringe, Flammenspiralen gewöhlicher Construction oder nach Fletscher oder mit dem Wobbe'schen Brenner. Für kleinere Apparate genügen ein oder mehrere Bunsenbrenner, ev. in Form eines mehrfachen Brenners. Für die relativ niedrigen Temperaturen der Brütöfen genügen leuchtende Flammen, oder man wählt die sich selbst regulirenden und ev. auslöschenden, von Pfeil angegebenen und von Koch verbesserten Brenner; die leuchtenden Flammen werden durch Glimmerhüllen gegen Zug geschützt.

Zur Regulirung des Gasdruckes bedient man sich oft mit Erfolg besonderer Gasdruckregulatoren, von denen der von Moitessier relativ zufrieden stellen dürfte. Ausserdem bedarf man meist noch besonderer Thermoregulatoren. Die bis jetzt gangbarsten derselben schliessen sich an das Princip der Quecksilberregulatoren von Reichert an; ist das Quecksilbergefäss sehr gross, wodurch ein besseres Functioniren ermöglicht wird, so nennt man dieselben auch Freiburger Regulatoren. Zum Einstellen auf bestimmte Temperaturen kann man nach Andreae und Lothar Meyer über dem Quecksilber Flüssigkeiten, wie Aether oder Alkohol, anbringen, welche bei bestimmten Temperaturen sieden, deren gesättigten Dämpfe also auf das Quecksilber bei Steigen der Temperaturen einen Druck ausüben, der das Steigen oder Fallen der Quecksilbermasse feiner regulirt, als wenn nur die Temperatur auf das Quecksilber wirkt. Für 10 bis 30° wählt man Aether, für 30 bis 70° Alkohol. Die Empfindlichkeit der auf der Ausdehnung von Flüssigkeit beruhenden Thermoregulatoren kann je nach dem Volumen und dem Ausdehnungscoefficienten der angewandten Flüssigkeit über $^1/_{20}{}^0$ gesteigert werden. Ein weiterer Vorzug dieses Prinzips besteht in der Unabhängigkeit von den Schwankungen des Luftdruckes, so dass es für längere Arbeitsperioden unbedingt zu bevorzugen ist. Statt der Ausdehnung der gesättigten Dämpfe der Flüssigkeiten, d. h. ihrer schnellen Dampfbildung bei bestimmter Temperatur und der Ausdehnung dieser Dämpfe, kann man sich auch nach Soxhlet

[1]) z. B. Krasilstchick: Annales de l'Institut Pasteur 1889, III, S. 166.

vortheilhaft der Ausdehnung der Flüssigkeiten selbst bedienen. Eine Verbesserung haben die letzteren Apparate neuerdings durch Rohrbeck erfahren. Man kann auch die Dampftensionsregulatoren mit electrischer Auslösung versehen, welche aber eine sehr sorgfältige Arbeit und strengere Controlle erfordern und doch noch oft im Stiche lassen. Die gewöhnlichen elektrischen Thermoregulatoren befriedigen wegen ihrer grossen Schwankungen nicht. Die Membranregulatoren sind auf bestimmte Fälle beschränkt.

Glasgegenstände. Dieselben müssen besonders von organischen Substanzen frei sein, dürfen für bestimmte Fälle, z. B. wenn sie Harnstoff aufnehmen sollen, keine in den Flüssigkeiten lösliche Substanzen enthalten und dürfen keine Fettschichten haben, welche das Befeuchten verhindern.

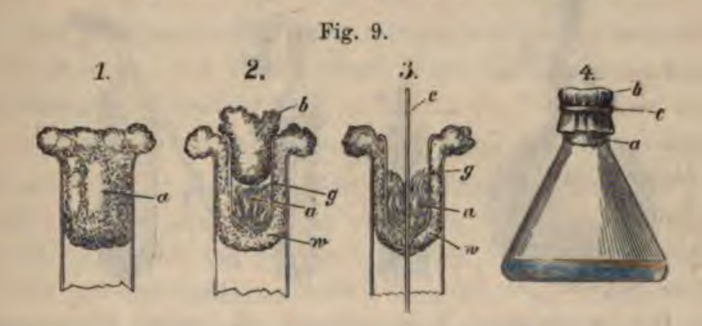
Sämmtliche Glasgegenstände, welche Form sie auch haben, müssen zuerst einer mechanischen Reinigung unterworfen werden, indem sie abgebürstet, abgerieben oder öfters mit Wasser ausgeschüttelt werden. Dann folgt die sorgfältige chemische Reinigung. Platten, Objectträger etc. werden in eine Schüssel mit dem Reinigungsmittel gelegt, Kölbchen werden mit demselben zu einem Drittel gefüllt und geschüttelt. Man spült zunächst mit einer ziemlich dunkelrothen Lösung von übermangansaurem Kali, lässt dies dann ablaufen und spült sofort mit der gewöhnlichen Salzsäure nach. Darauf wird so lange mit Wasser nachgespült, bis die saure Reaction verschwunden ist. Bisweilen genügt es, die Glasgegenstände mit irgend einer Mineralsäure, Salzsäure, Salpetersäure oder Schwefelsäure, kurz zu behandeln und dann wieder mit Wasser nachzuspülen und hin und wieder reicht ein einfaches Ausspülen mit reinem Wasser aus. Ob man sich mit diesem letzteren Minimum begnügen oder den ganzen Process gewissenhaft durchführen soll, richtet sich nach dem Grade der Verunreinigung und den besonderen Zwecken. Glaskolben, welche zur Aufnahme von Harnstofflösungen dienen sollen, müssen nach der ersten Reinigung noch mindestens 24 Stunden mit warmem Wasser gefüllt stehen bleiben oder noch besser einige Mal mit Wasser angefüllt im gespannten Dampfe ausgekocht werden und in den Pausen zwischen dem Kochen mit Wasser angefüllt stehen bleiben, weil die nicht derart lange Zeit mit Wasser behandelten

Glas-Gefässe dem Inhalt eine schwach alkalische Reaction verleihen, welche nach Leube schon zur Lockerung der Harnstoffmoleküle genügt. Auch bei Milch ist diese alkalische Beschaffenheit des gewöhnlichen weichen Glases sehr störend, weil dieselbe dadurch eine gelbliche bis braune Farbe annimmt. Man muss demnach auch die Milchgefässe in ähnlicher Weise vorbereiten oder man kann nach Marpmann Kolben von böhmischem Glase verwenden.

Die ab- resp. ausgespülten Glasgegenstände werden nunmehr getrocknet. Man lässt das überschüssige Wasser ablaufen und setzt a) die Gegenstände bei ca. 100 bis 120° einige Zeit in den Trockenschrank oder man nimmt b) die letzten Spuren Wasser mit Alkohol und nach Abgiessen desselben die Reste des Alkohols mit Aether auf, den man abgiesst und dessen letzte Spuren man an der Luft verdunsten lässt oder noch schneller direkt durch Erwärmen über einer Flamme entfernt.

Die getrockneten Glasgegenstände müssen dann sterilisirt werden. Die Glasplatten, Glasbänke, werden in Behälter von Eisenblech eingelegt und mit diesen 2 Stunden im Trockenschrank bei 150 bis 160° gehalten. Glastrichter, Bechergläser, Glasschalen

Fig. 9.

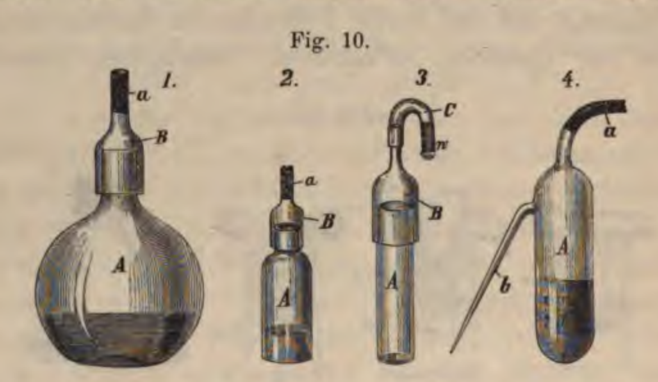


werden direkt in den Trockenschrank gesetzt. Kolben, Reagirgläser, Medicinflaschen, Saftfläschchen erhalten vor dem Sterilisiren einen besonderen Verschluss. Der einfachste, von Schröder und v. Dusch eingeführte, besteht darin, dass man einen Wattepfropf, Fig. 9 (1 a), fest einpresst. Fitz und Brefeld haben oft einfach eine doppelte Lage Filtrirpapier als Verschluss verwendet und noch öfters ist es gut, beides zu vereinigen und über den Watteverschluss,

Fig. 9 (4 a), eine doppelte Lage Filtrirpapier oder Leinwand b, mit Bindfaden oder Gummiring c, festzubinden. Im letzteren Falle kann sich auf der Watte nicht unmittelbar keimhaltiger Staub aufsetzen. Da dieser Verschluss für die gewöhnlichen Versuche aber etwas zeitraubend ist, begnügt man sich in der Regel mit dem einfachen Watteverschluss. Durch das Anbrennen desselben zum Zwecke des Zerstörens etwa aufgefallener Keime leidet aber dieser Verschluss sehr dadurch, dass der Pfropf kleiner und lockerer wird. Bartoschewitsch[1]) hat deshalb vorgeschlagen, die Wattepfröpfe mit Wasserglas zu benetzen und diesen so befeuchteten oberen Theil, so lange er feucht ist, mit den Fingern in die Form eines den Glasrand übergreifenden pilzförmigen Kopfes zu bringen, der beim Sterilisiren hart, formbeständig und feuerfest wird.

Statt dieser Imprägnation der Watte kann man natürlich auch von vornherein feuerfeste Watte verwenden und bei kleineren Dimensionen verwendet man schon längst neben der Watte Asbest oder Glaswolle. Fol hat einen complicirteren Verschluss angegeben.

Fig. 10.



In den Hals des Gefässes kommt zuerst eine dünne Watteschicht, Fig. 9 (2 w), welche durch eine glockenförmige Glaskappe, g, fest in den Hals eingetrieben wird, so dass zwischen der Oeffnung dieser Glasglocke und dem Innenraum des Glasgefässes nur eine dünne trennende Watteschicht besteht. In das Glasglöckchen giebt man dann einen Asbestpfropf a und darüber einen Wattepfropf b.

---

1) Centralblatt für Bakteriologie 1888, Bd. IV, No 7.

Statt der gewöhnlichen Form der Oeffnungen der Glaskolben kann man sich der von Pasteur angegebenen Form Fig. 10 (1) bedienen. Auf den Hals des Kolbens A ist ein helmartiger Aufsatz B aufgeschliffen, der oben in den Hals a ausläuft, der den Watte- oder Asbestverschluss aufnimmt. Der Rand des Kolbens A bleibt in Folge dieses Aufsatzes vor jeder Berührung bewahrt. Figur 10 (2) zeigt dasselbe Princip in Form der von Freudenreich eingeführten kleinen Fläschchen. Die Form Figur 10 (3) rührt von Salmon her; dabei ist auf den Kolben A der Helm B aufgeschliffen und auf diesen erst der umgekehrt U-förmige „Ventilator" C, dessen nach unten gekehrter Schenkel den Watteverschluss w aufnimmt.

Reagirgläser werden nach dem Anbringen des Verschlusses in Drahtkörben, Fig. 8 d, in den Trockenschrank gesetzt. Pipetten und Büretten werden gleichfalls an den Oeffnungen mit kleinen Pfröpfen aus Watte, Glaswolle oder Asbest versehen; man stellt dieselben mit der zum Aufsaugen bestimmten unteren Oeffnung in Becher- oder Cylindergläser, auf deren Boden sich eine Schichte Glaswolle befindet. Diese Instrumente bleiben am besten bis unmittelbar vor dem Gebrauche im Trockenschrank.

Das Sterilisiren aller dieser Glasgegenstände erfolgt bei 150° 1 Stunde lang. Die Watte nimmt dabei einen leichten Stich ins gelbliche oder bräunliche an.

Das Sterilisiren von Reagirgläsern kann man ev. in folgender Weise nach Koch abkürzen: Man reinigt dieselben zuerst mit 1 p. M. Sublimatlösung, giesst diese ab und nimmt die Reste Sublimat mit Spiritus auf, giesst den Spiritus ab, trocknet das Glas, indem man es über eine Spiritusflamme hält. Dann wird ein Wattepfropf mit stark erhitzter Pinzette einige Centimeter weit in das Reagirglas eingeschoben, darauf der untere Theil des Glases über der Flamme bis zum Wattepfropf stark erhitzt. Nachdem das Glas soweit abgekühlt ist, dass man es am unteren Theile anfassen kann, wird das obere Drittel so stark und lange erhitzt, bis die Watte sich bräunt. Nach dem Abkühlen zieht man mit erhitzter Pinzette den Wattepfropf so weit hervor, dass man ihn gerade mit den Fingern fassen kann.

Kork ist als Verschluss möglichst zu vermeiden; soll er verwendet werden, so muss er mehrere Stunden lang ausgekocht werden. **Gummi**gegenstände werden erst mit Seife und warmem Wasser abgebürstet, mit Wasser abgespült, darauf bis zu einer Stunde in 1 p. M. Sublimatlösung gelegt, dann mit ausgekochtem und wieder abgekühltem Wasser gründlich abgespült und darauf ev. noch 15 Minuten in strömendem Dampf ausgekocht.

Die sterilisirten Gefässe sind nunmehr zur Aufnahme der vorbereiteten Nährlösungen und anderen Nährmedien fertig. Zu diesem Zwecke nimmt man bei Verschlüssen mit Watte und Filtrirpapier erst das letztere ab und legt es auf eine Glasplatte zur Seite, dann lockert man durch Drehen mit einer Pinzette den Watteverschluss und setzt diesen mit einer Schieberpinzette so zur Seite, dass er nicht beschmutzt werden kann. Darauf füllt man Flüssigkeiten mit Hülfe eines Trichters ein, Reagirgläser etwa zu einem Drittel bis zur Hälfte, Kolben nach Bedarf, setzt darauf den Watteverschluss wieder auf und bindet ev. wieder die Kappe von Filtrirpapier über. Bei den helmartigen Uerschlüssen von Pasteur, Fig. 10 (1 u. 2), geschieht das Einfüllen in die Kolben, A, unter Abnahme des Helmes B; ebenso verfährt man bei dem Salmon'schen Verschluss, Fig. 10 (3).

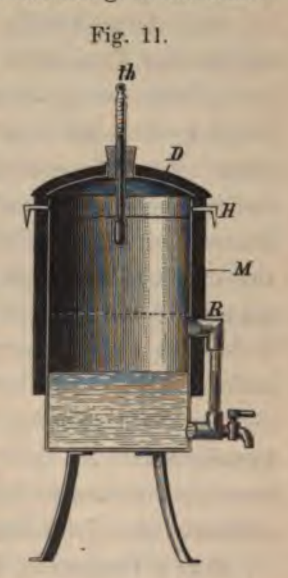
Diese nunmehr in sterilisirten Gefässen befindlichen Nährlösungen müssen selbst sterilisirt werden. Hin und wieder ist es nicht erforderlich, das ganze auf den ersten Blick etwas umständlich erscheinende Verfahren, vorherige besondere Sterilisation der Gefässe und nachherige Sterilisation der noch nicht sterilisirten Lösungen in diesen Gefässen, gesondert vorzunehmen, sondern man kann nach H. Buchner und v. Freudenreich oft einfacher die Nährmedien direkt in die nur getrockneten, aber noch nicht sterilisirten Gefässe einfüllen, mit nicht sterilisirtem Wattepfropf schliessen und die Sterilisation von Gefäss, Inhalt und Verschluss gleichzeitig vornehmen. Besonders ist dies dort vortheilhaft, wo man sich zum Sterilisiren der gespannten Dämpfe bedienen kann, z. B. bei Agar-Lösungen, Bouillon.

Zum **Sterilisiren der Nährlösungen und der anderen Nährsubstrate** stehen mehrere Methoden zu Gebote.

Am längsten bedient man sich der Siedetemperatur des Wassers in Form des **Kochens** der Nährsubstrate. Grössere

Kolben werden direkt über der Flamme, kleinere Kolben, Reagirgläser in einem gewöhnlichen Wasserbade gekocht, in dem aber das Wasser etwas höher stehen soll als der Inhalt der Gläser. Der Wärmeausgleich vollzieht sich bei den unvermeidlichen Wärmeverlusten etwas langsam und vor Allem sehr ungleichmässig. Zum längeren Kochen empfiehlt sich ein tiefes cylindrisches Wasserbad mit constantem Niveau, dessen zur Regulirung der Wasserhöhe dienender Seitentubus so hoch sein muss, dass das Wasser im Bade höher gehalten werden kann als der Inhalt der Kolben und Gläser. Für Reagirgläser dient ein mit vielen kreisförmigen Oeffnungen versehener Einsatz, dessen durchbrochener Boden etwa 1 cm über dem direkt von der Flamme getroffenen Boden des Wasserbades sich befindet. Dass man oft mit 100 ° C. in Form des siedenden Wassers auskommen kann, haben schon ältere Versuche von Pasteur und seinen Vorgängern gezeigt, dass man bisweilen damit auskommen muss, ergiebt sich von selbst in Fällen, bei denen Temperaturen über 100 ° C. Alterationen der Substrate und Lösuneng herbeiführen.

Fig. 11.



Wenn auch genügend langes Kochen bei 100 ° C. wirkliches Sterilisiren gestattet und der sichere Erfolg bei dieser Methode wesentlich nur von der Zeit abhängt[1]), so verwendet man die Siedetemperatur des Wassers doch besser in Form **strömender nicht gespannter Dämpfe.** Hierzu dient der Dampf-Sterilisirungs-Cylinder von Koch, Gaffky und Löffler[2]) Fig. 11. Derselbe besteht in einfachster Form aus einem ca. $^1/_2$ Meter hohen, 20 bis 25 cm im Durchmesser haltenden Cylinder von starkem Weissblech, M, der zum Schutze gegen Wärmeverluste mit einem Filz- oder Asbestmantel umgeben und mit Boden von Kupferblech versehen ist. Im

---

1) Hueppe, Ueber einige Vorfragen zur Desinfectionslehre und über die Hitze als Desinfectionsmittel. Deutsche militärärztl. Zeitschr. 1882, No. 3.

2) Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte 1881. I. S. 322.

Inneren befindet sich im unteren Drittel bei R ein Rost; der Raum unter demselben wird zu etwa $^3/_4$ mit Wasser gefüllt, welches durch Unterstellen von mehreren Gasflammen (Drei- oder Fünfbrenner) oder durch einen Flammenkranz schnell in's Sieden gebracht und durch eine Flamme im Sieden gehalten wird. Als Verschluss dient ein helmartiger Deckel, D, aus Weissblech mit Filz- oder Asbestüberzug, der nicht ganz hermetisch schliesst, so dass der Dampf an den undichten Stellen entweichen kann. Im Helme wird ein Thermometer, th, angebracht. Kleine Formabweichungen, welche bei der Herstellung angewendet werden, haben an dem Princip nichts geändert.

Dem Apparate ist ein Einsatzgefäss beigegeben, in welches die kleinen Kolben, Gläser etc. gestellt werden; an den Henkel des Gefässes oder am Halse grösserer Kolben befestigt man Schnüre zum bequemen Heben und Senken, welche man an die am Rande des Cylinders befindlichen Haken, H, anbindet. Die Zeit des Sterilisirens beträgt ca. 2 Stunden.

Der Apparat kann auch etwas grössere Dimensionen haben. Bei starker Ueberschreitung dieser Dimensionen sind Salzlösungen erforderlich, wenn der Dampf beim Ausströmen 100° haben soll. Dadurch, dass der Dampf nicht ganz frei entweichen kann und eine Abgabe der Wärme nach Aussen durch Strahlung verhütet wird, ist die Temperatur im Inneren von der Oberfläche des Wassers bis zum Helme eine fast gleichmässige und da der Deckel nicht hermetisch abgeschlossen ist, übersteigt die Temperatur des Dampfes die Siedetemperatur nicht, sondern giebt die den Druckverhältnissen entsprechende Siedetemperatur des Wassers, d. h. bei annähernd normalem Barometerstande ca. 100° C.

Die Vortheile des Apparates liegen in der Billigkeit und der Unmöglichkeit bei Anwendung von Wasser 100° zu übersteigen, so dass alle Substanzen damit sterilisirt werden können, welche 100° ertragen, aber bei Steigerung über 100° alterirt werden. Der Ausgleich der Temperatur geht sehr prompt von Statten und die technische Ausführung der Apparate kann kaum einfacher sein und damit wird die Abhängigkeit von der technischen Ausführung auf ein Minimum reducirt. Der Apparat hat durch Muencke, Rohrbeck,

Buddeberg Verbesserungen erfahren. Petri[1]) lässt den Dampf nach dem Vorgang der Desinfectionsapparate von Buddeberg, Overbeek de Meyer von oben einströmen, ebenso Ostwalt, dessen Apparat auch ein Nachtrocknen gestattet.

Die Siedetemperatur des Wassers kann man nach Tyndall oft sehr gut in Form des **discontinuirlichen Kochens** anwenden. Manche Substanzen, welche durch Temperaturen über 100° oder durch sehr langes Kochen verändert werden, werden bisweilen durch dieselben Temperaturen nicht wesentlich alterirt, wenn dieselben nicht auf einmal längere Zeit hintereinander, sondern öfters nur kurz und in Intervallen einwirkten. Ebenso ist dies Verfahren zu empfehlen, wenn man durch die Siedetemperatur in einer Sitzung die Sterilisation nicht sicher erreicht. So kocht man z. B. Kartoffeln, Brodbrei und derartige Substanzen am besten drei Tage hintereinander jeden Tag 20 bis 30 Minuten. Das discontinuirliche Kochen kann direkt auf dem Feuer oder im Wasserbade oder im strömenden Dampfe vorgenommen werden.

Dem Wasserbade sind die strömenden Dämpfe durch Sicherheit und relative Kürze der erforderlichen Zeit weit überlegen, weil störende Beeinflussungen von der Umgebung wegfallen. Dies bezieht sich einmal auf die Verminderung der Wärmeverluste durch Strahlung und dann darauf, dass in den Apparaten keine Mischung von Luft und Wasserdampf, sondern nur Wasserdampf vorhanden ist. Koch, Gaffky und Löffler hatten zuerst dem strömenden Dampfe eine besonders geartete Fähigkeit für die Desinfection zugeschrieben und ihn sogar den gespannten Dämpfen von höherer Temperatur für überlegen gehalten, weil sie bei Verwendung eines Naegeli'schen Dampfkochtopfes schlechte Resultate erhalten hatten. Schon in der ersten Auflage dieses Werkes hatte ich demgegenüber den Vorbehalt gemacht, dass man a priori vom gespannten Dampfe bessere Leistungen erwarten müsste, als vom strömenden Dampfe, „da nach den Gesetzen der dynamischen Wärmetheorie mit Steigerung der Temperatur die Zeit des Wärmeausgleichs und damit die Zeit des Sterilisirens abnehmen müsste“.

---

[1]) Arbeiten a. d. K. Gesundheitsamte 1890, VI. S. 498.

Thatsächlich hatten auch die langjährigen Erfahrungen von Naegeli, H. Buchner, Pasteur und Fitz bewiesen, dass bei richtiger Verwendungsweise des gespannten Dampfes die Resultate besser waren als die des strömenden Dampfes in den Versuchen von Koch, Gaffky und Löffler. Dies beweisen besonders die direkten Angaben von Fitz[1]) und Heydenreich[2]) und in Koch's Laboratorium selbst ermittelte Globig[3]) später, dass einzelne Sporenarten bis zu 3 und mehr Stunden im strömenden Dampfe gelassen werden konnten, ohne zu Grunde zu gehen, während sie im gespannten Dampfe von 110 bis 120° bereits nach 15 Minuten abgetödtet waren. Da demnach der gespannte Dampf jetzt in Koch's Laboratorium so wirkt, wie er in Naegeli's und Pasteur's Laboratorium immer gewirkt hat und mehr leistet als strömender Dampf, muss die Erklärung für manche schlechte Leistungen von Apparaten für gespannten Dampf in unrichtiger Anwendungsweise derselben zu suchen sein und die physikalische Erklärung des Strömens muss eine andere werden.

Die grösseren Apparate für die Desinfectionspraxis haben uns dann durch die Thermotechniker Walz und Windscheid[4]) auf den richtigen Weg gebracht und M. Gruber[5]) kam zu denselben Ergebnissen. Da Luft ein viel schlechterer Wärmeleiter als Wasserdampf ist, muss aus jedem zur Sterilisation und Desinfection dienenden Dampfapparate erst alle Luft durch Wasserdampf verdrängt sein; dass auch die Dicke der Wandungen der eingesetzten Gefässe, ähnlich wie Luft, leitungshemmend wirkt, versteht sich von selbst. Das letztere ist aber ein unvermeidlicher Fehler, während die Hemmung von seiten der Luft beseitigt werden kann und muss. Lässt man in einem Apparate für gespannten Dampf statt reinen Dampfes ein Gemisch von Luft und Dampf, so setzt man seine Leistungsfähigkeit direct physikalisch herab. Man muss also bei diesen Apparaten einige Zeit nach dem Anwärmen den Inhalt von Luft und Dampf ausströmen

---

[1]) Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 1884, Bd. 17, S. 1188.
[2]) Zeitschrift für wissenschaftl. Mikroskopie 1887, Bd. 4, S. 1.
[3]) Zeitschrift für Hygiene 1887, III, S. 322.
[4]) Die Desinfectionsapparate für Städte und Krankenhäuser 1887.
[5]) Centralblatt für Bakteriologie 1888, III, S. 20.

lassen, um die Luft zu verdrängen, dann erst enthält der Apparat reinen Wasserdampf. Bei den Koch'schen Apparaten dagegen wird die Luft durch das fortwährende Strömen von selbst von Anfang an rasch und sicher aus dem Apparate weggespült und man hat nicht nöthig auf die Reinheit des Dampfes noch besonders zu achten. Von dem Momente an aber, wo im Apparate die Luft verdrängt und der Wasserdampf rein ist, wird das Strömen des Dampfes schädlich. Es muss unvermeidlich ein Verlust an Energie eintreten. Ist der Wasserdampf erst einmal rein, so muss er um so mehr leisten, je höher seine Temperatur ist nnd je mehr er sich in Ruhe befindet. Beide letztere Momente, Ruhe des Dampfes und höhere Temperatur, sichern den gespannten Dämpfen für die Zukunft in der Sterilisationstechnik und Desinfectionspraxis ihre Ueberlegenheit über die strömenden Dämpfe. Apparate, wie der von Viquerat[1]), bei denen gespannnte Dämpfe von 150° C. zum Strömen gebracht werden, sind deshalb nicht zu empfehlen.

Der Dampf einer bestimmten Temperatur zeigt, je nachdem er gesättigt oder trocken (überhitzt) ist, verschiedenen Druck. Gase dehnen sich bei Erhöhung der Temperatur um 1° um $^1/_{273}$ des Anfangs-Volumens aus. Bei einem Anfangsdruck von 1 Atm. nimmt demnach bei Erhöhung der Temperatur von 100° auf 101° der Druck des überhitzten (trocknen) Dampfes nur um 2,07 mm zu, während der des gesättigten Dampfes aber um 27 mm zunimmt. Wenn der Wasserdampf nicht rein ist, so ist der beobachtete Druck grösser als der sich aus der Regnault'schen Regel für die betreffende Temperatur ergebende. Ebenso ist die Temperatur des überhitzten Dampfes höher als die dem Drucke entsprechende. Nur wenn der Wasserdampf rein und gesättigt ist, zeigt das Manometer den der Temperatur entsprechenden Druck an. Nur bei reinem, gesättigten, nicht aber bei trocknem und überhitztem Dampfe kann aus der Temperatur ein Schluss auf den Druck und umgekehrt gezogen werden. Da die Digestoren, um den Druck auszuhalten, starkwandig sein müssen, werden die Wandungen direct überhitzt und dadurch kann auch der im Apparate

1) Centralblatt für Bakteriologie 1889, VI, No. 22.

über den Flüssigkeiten gebildete Dampf überhitzt werden. Man muss deshalb stets Temperatur und Druck ablesen, um über die Reinheit des Dampfes sicher zu sein, von der die prompte Leistungsfähigkeit des Apparates abhängt.

Nach dem vorher Gesagten, ist der Digestor, der Dampfkochtopf oder Papin'sche Topf für **gespannten Dampf** der Sterilisationsapparat für alle Substanzen, welche mehr als 100° C. vertragen. Da dies die meisten Substanzen sind, so dürfte er wohl schon jetzt als der Sterilisationsapparat der Zukunft zu bezeichnen sein, der allmählich in den Laboratorien die Stelle einnehmen muss, welche bei uns jetzt oft dem Apparate für strömenden Dampf eingeräumt wird. Bei bescheideneren Mitteln hat man damit zu rechnen, dass der Apparat theuerer ist als der Koch'sche und dass man in diesem billigen Apparat durch discontinuirliches Kochen in längerer Zeit dasselbe Resultat erhalten kann. Auf der anderen Seite ist aber die Zeit auch sehr kostbar und viele Substanzen leiden bei der kurzen Zeit, welche zum sicheren Sterilisiren bei 110 bis 120° erforderlich ist, weniger, als bei den vielen Stunden, welche sie im strömenden Dampfe von 100° verbringen müssen.

Fig. 12.



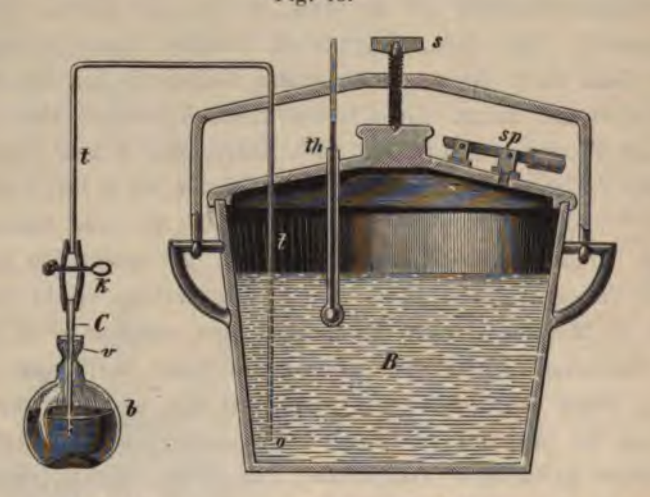
Eine sehr gute Form ist die von Heydenreich nach den Erfahrungen aus Naegeli's und Pasteur's Laboratorium angegebene, Fig. 12. Die kleineren Apparate von 30 cm Höhe und 20 cm Breite erfordern zum Anheizen mit der genügenden Anzahl Flammen der Heizringe K und L 8 bis 10 Minuten, die mittleren Apparate von 45 cm Höhe und 30 cm Durchmesser etwa 10 bis 15 Minuten. Der kleinere Kessel fasst etwa 2 bis 3, der grössere 5 bis 6 Liter Wasser. Der eigentliche aus Kupfer gearbeitete Kessel ist umgeben von einer Umhüllung, H, aus Eisenblech, welche die Wärme der Flammen

ohne Verlust zur Wirkung bringt. In dem Kessel selbst befindet sich ein Dreifuss, der das Drahtnetz G trägt, auf welches die Kolben etc. ev. direct gestellt werden. Um die Sachen besser Einbringen und Herausheben zu können, dient oft ein passendes Einsatzgefäss in Cylinderform aus Blech oder Drahtnetz. Der mit den Handhaben C und D versehende Deckel wird durch die besonders construirten Klemmen, welche sich um E drehen, auf den Wall W angepresst. Der Deckel trägt das Manometer M, das Thermometer Th und ein mit Gewicht stellbares Ventil V, welches seitlich noch einen Ablasshahn X hat. Der Wasserdampf von 120° vernichtet bei Flüssigkeitsmengen bis zu etwa 50 ccm alle Keime innerhalb 10 Minuten. Um dies zu erreichen verfährt man in folgender Weise: Man stellt die zu sterilisirenden Gefässe in das cylindrische Blechgefäss und darauf dieses in den kalten Kochtopf. Dann zündet man alle Flammen an und hält den Ablasshahn X zum Vertreiben der Luft so lange offen, bis das Thermometer Th 2 bis 3 Minuten ca. 100° und das Manometer M nicht mehr als eine Atmosphäre anzeigt. Dann schliesst man den Hahn X und bringt den Apparat auf die Temperatur von 120°. Diese Temperatur, welche in etwa 10 bis 15 Minuten erreicht wird, lässt man nunmehr noch 10 Minuten einwirken und nur bei Kolben mit mehr als 50 ccm Inhalt und bei festen Substraten muss man diese Zeit überschreiten. Damit sich der Apparat für diese Temperatur von 120° (oder ev. eine andere gewünschte Temperatur) von selbst regulirt, muss man vorher das Ventil durch Vor- oder Zurückschieben des Gewichtes einstellen. Dann löscht man die Flammen aus, öffnet den Hahn X von Zeit zu Zeit ein wenig, um den Dampf ganz langsam innerhalb 3 bis 5 Minuten abzulassen; würde man schneller vorgehen, so würde die Flüssigkeit in den Kolben ins Sieden kommen und herausgeschleudert werden. Wenn bei diesem Abkühlen die Temperatur von 100° und der Druck einer Atmosphäre wieder eingetreten und dadurch ein ev. Ueberkochen verhütet ist, schlägt man die Haken E herab, nimmt den Deckel ab und kann nun den Blecheinsatz mit den Kolben herausheben.

Bei diesen Apparaten müssen die in Kolben sterilisirten Lösungen zum Inficiren oder Vertheilen in kleinere Gefässe unter Abnehmen

des Deckels aus dem Apparate entfernt und ausserhalb zeitweilig geöffnet werden. Um dem zu entgehen, hat Fol[1]) einen kleineren Apparat gewählt, in dem die Nährlösungen direct erhitzt werden. Der Apparat, Fig. 13, wird soweit gefüllt, dass das untere Ende des Thermometer-Tubus th sicher eintaucht. Dann wird der Deckel durch die Schraube s fest angezogen. Während des Kochens ist die Metallröhre t, welche vorher schon für sich sterilisirt war, so weit herausgezogen, dass das untere Ende o etwas unterhalb des Deckels, etwa beim Buchstaben t, steht; in Folge des Schlusses der Klemme k

Fig. 13.



kann durch die Röhre t kein Dampf entweichen. Bei zu starker Spannung tritt das Sicherheitsventil sp. in Thätigkeit. Das Ueberfüllen der Flüssigkeit B in den Kolben b geschieht ohne Oeffnung des Deckels einfach dadurch, dass nach dem Erkalten die Röhre t in die Flüssigkeit B heruntergedreht und die Klemme k geöffnet wird. Die Flüssigkeit geht dann von o aus durch die Röhre t und die Kanüle C in den Kolben b; die einzige besonderer Beachtung bedürftige Stelle der Leitung befindet sich im Halse des Kolbens bei v, der durch einen besonderen Verschluss geschützt ist. Ein

[1]) Nouvelle méthode pour le transvasage de bouillons stérilisées. Archives des sciences physiques et naturelles. Genève, Bd. XI 1884, S. 557.

solcher Apparat findet seine Anwendbarkeit wohl gelegentlich dann, wenn zu bestimmten Versuchen bestimmte Lösungen in grösseren Mengen hintereinander Verwendung finden sollen.

Will man ohne Dampfkessel Temperaturen über 100° anwenden, so bedient man sich der **Salz-, Oel- oder Paraffinbäder.**

Miquel[1]) verwendet Bäder von Chlorcalcium oder Natriumnitrat, in welchen die vorher vor der Lampe zugeschmolzenen Ballons etc. untergetaucht gehalten werden. Da die äussere Flüssigkeit erst bei ca. 110° kocht, die Flüssigkeit in den Ballons aber schon bei 100° C. kochen kann, platzen in Folge dieser Druckdifferenzen viele Kolben. Werden die Kolben etc. nicht zugeschmolzen und nicht untergetaucht, so tritt in den Salz- etc.-Bädern kein vollständiger Ausgleich der Temperatur im Innern der Kolben und in den Bädern ein.

Durch die bisher betrachteten Temperaturen von 100 und mehr Grad C. werden manche Substanzen alterirt; der Zucker beginnt sich zu zersetzen, eine Coagulation der Albuminate tritt ein, die amphotere Reaction der Milch geht in eine schwach, aber deutlich sauere über, manche Ammoniakverbindungen werden zersetzt, Harnstoff wird hydratisirt. Um dieses zu vermeiden, wendet man nach Tyndall statt des continuirlichen oder discontinuirlichen Kochens allgemein die **discontinuirliche Sterilisation bei Temperaturen unter 75°**, unter der Gerinnungstemperatur des Eiweiss, an. Die Berechtigung dieser Methode liegt in der Erfahrung begründet, dass die meisten lebenden Bakterien unterhalb der Gerinnungstemperatur des Eiweiss bei relativ niedriger Temperatur getödtet werden, während die Dauersporen, der wichtigste Grund der Anwendung hoher Temperaturgrade[2]), an sich durch diese niedrigen Temperaturen nicht vernichtet werden, wohl aber wenn sie auskeimen. Lässt man nun Temperaturen unter 75°, etwa zwischen 62 und 65° C. ein bis zwei Stunden auf die zu sterilisirende Flüssigkeit einwirken, so werden sofort nur die lebenden Bakterien, und

[1]) Les organismes vivants de l'atmosphère, 1883, S. 144.

[2]) Cohn: Untersuchungen über Bakterien IV: Die Bakterien und die Urzeugung. Beiträge zur Biologie der Pflanzen Bd. II, Heft 2, S. 249, 1876.

vielleicht diese nicht einmal sämmtlich getödtet. In der zusagen-uəp Lösung keimen dann etwaige Dauersporen aus, die einen am zweiten, die andern am dritten oder einem folgenden Tage. Lässt man nun dieselbe Temperatur an einem zweiten oder dritten Tage ebenso einwirken, so vernichtet man jedesmal die lebenden resp. ausgekeimten Bakterien, und wenn man dies genügend lange fortsetzt, gelingt es auf diese Weise unterhalb der Zersetzungstemperaturen viele, vielleicht alle Flüssigkeiten zu sterilisiren. Im Allgemeinen empfiehlt sich eine Temperatur von ca. 58° C. 5 bis 8 Tage hintereinander 1 bis 2 Stunden einwirken zu lassen.

Gegen diese Methode ist besonders von Miquel[1]) der prinzipielle Einwand erhoben worden, dass es nach seinen[2]) und van Tieghem's[3]) Beobachtungen einige Bakterien giebt, welche schon in ihren vegetativen Zellen Temperaturen zwischen 72 und 74° Widerstand leisten, also sicher den Temperaturen von 52 bis 68° widerstehen, und der weitere Einwand, dass eine scheinbare Sterilisirung, angezeigt durch Klarbleiben der Lösungen nach 8 Tagen, noch keine wirkliche Sterilisirung beweist, weil einzelne Bakterien längere Zeit zu ihrer Entwickelung gebrauchen als nur 8 Tage. Weiter hat Globig[4]) ermittelt, dass es Bakterien giebt, welche erst über 50° wachsen und ich habe beim Sterilisiren von Blutserum der Gruppe der Kartoffelbacillen angehörige Bakterien gefunden, welche noch nachträglich auskeimten, als ich nach anderweitigen Erfahrungen die Sterilisation für vollendet halten durfte. Gegen diesen Fehler kann man sich etwas schützen, wenn man nach etwa 5 bis 6tägigem discontinuirlichem Erwärmen eine Pause von 2 bis 3 Tagen eintreten lässt, während der man die Kulturen in den Brütofen stellt, und wenn man dann das discontinuirliche Sterilisiren bei 58° noch an 2 Tagen wiederholt.

Man kann dies im Wasserbade und etwas besser durch den von Koch angegebenen Apparat, Fig. 14, erreichen. Derselbe besteht

[1]) Les organismes vivants de l'atmosphère 1883, S. 183, Annuaire de l'observatoire de Montsouris pour l'an 1885, S. 571.

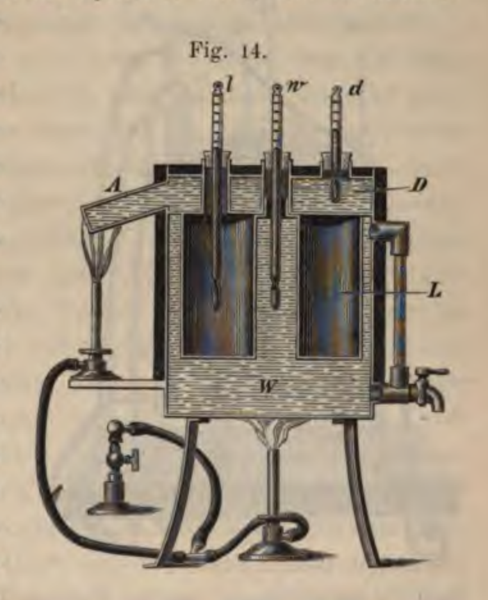
[2]) l. c. und Annuaire pour l'an 1881.

[3]) Bulletin de la Société botanique de Françe 1881, S. 35.

[4]) Zeitschrift für Hygiene 1887, Bd. III, S. 294.

aus einem Doppel-Cylinder von Kupferblech, der mit Wasser W gefüllt und durch einen Deckel gut verschlossen wird, der gleichfalls mit Wasser D gefüllt wird. Der Deckel hat seitlich einen mit dem Hohlraum des Deckels communicirenden Ansatz A, welcher durch die darunterstehende Flamme erhitzt wird, während der Cylinder selbst von unten durch eine Gasflamme erwärmt wird. Der Deckel trägt drei Tuben, deren einer zum Füllen des Deckels und zur Aufnahme eines Thermometers d dient, welches die Wärme des Wassers im Deckel anzeigt; ein zweiter Tubus l nimmt das Thermometer auf, welches in den Luftraum L des Cylinders führt, und der mittlere Tubus nimmt ein Thermometer w auf, welches in eine mit dem Wassermantel W communicirende central angebrachte Röhre geht. Die Füllung des Wassermantels geschieht durch einen seitlich angebrachten Tubus.

Fig. 14.



Roth[1]) wendet, um ganz constante Temperaturen unter 75° C. zu erhalten und die Beaufsichtigung des Apparates zu erleichtern, statt des Wassers die ungespannten Dämpfe des constant bei 61° C. siedenden Chloroforms an, welches in verschiedener Menge mit Benzin gemischt wird; so siedet z. B. Chloroform mit 10 Volumprocent Benzin bei 59°. Statt der von Koch gewählten Form hat Wiesnegg auf Wunsch von Fol[2]) ohne irgend welche Aenderung des Prinzips die etwas bequemere Einrichtung getroffen, Fig. 15, dass der Deckel in Wegfall gekommen ist. Die Oeffnung und Beschickung des Apparats geschieht nicht von oben durch einen Deckel, sondern

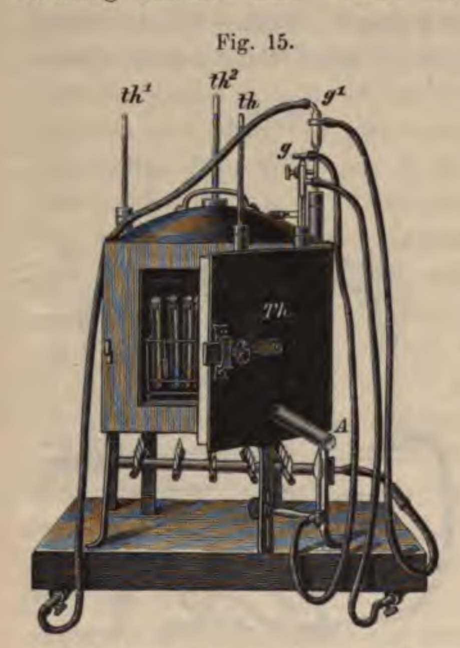
---

1) Deutsche med. Wochenschrift 1885, S. 135.

2) La culture des microbes. La Nature 1885, No. 619, S. 301.

von vorn durch eine mit Wasser gefüllte Thüre Th, deren Wassermasse mit dem Ansatze A communicirt, welcher durch die darunter befindliche mit der Thüre verbundene Flamme erwärmt wird, so dass Oeffnen und Schliessen der Thüre deren Temperatur nicht alterirt. Das Thermometer th und der Thermoregulatur g reguliren die Temperatur der Thüre, während die Thermometer th^1 und th^2 und der Thermoregulator g^1 die Temperatur des übrigen Theiles in Ordnung halten. Eine weitere Verbesserung hat Müncke auf meinen Vorschlag ausgeführt, indem er den Boden nicht horizontal hält, sondern nach unten und der Mitte abfallend verlaufen lässt; der Inhalt des Apparates wird dadurch der Wärmequelle mehr entrückt und der directen Wirkung des am meisten schwankenden Theiles des Apparates ganz entzogen; die Erwärmung des Apparates ist nicht nur durch die bessere Form des Bodens, sondern auch dadurch noch gleichmässiger gemacht, dass die Ableitungsröhren für die Verbrennungsgase den Wassermantel durchziehen.

Fig. 15.



Endlich habe ich an meinen kleinen Thermostaten die Einrichtung getroffen, dass er zugleich zum discontinuirlichen Sterilisiren und Erstarren von Serum dient, so dass ein besonderer Apparat zum letzteren Zwecke ganz überflüssig wird. Aehnliche Apparate hat Rohrbeck construirt.

Die discontinuirliche Sterilisation unter 75° wirkt auf manche Salzlösungen in Folge der langen Einwirkung ebenso zersetzend, wie die Siedetemperatur in kurzer Zeit. Zum Sterilisiren leicht zersetzlicher Ammoniaksalze und besonders des sehr leicht in kohlensaures Ammoniak zerfallenden Harnstoffs hatte ich es desshalb vortheil-

haft gefunden[1]) die Lösungen zunächst ohne das leicht zersetzliche Salz zu sterilisiren und erst nach dem Abkühlen das frisch hergestellte Salz zuzufügen und darauf die fertige Lösung nur noch kurze Zeit bei ca. 60° zu lassen. Dieses Verfahren ist für **Harnstoff** von Leube[2]) noch verbessert worden. Leube bestätigte zuerst die schon von Fitz mitgetheilte Erfahrung, dass Harnstofflösungen bei und über 100° überhaupt nicht zu sterilisiren sind, aber er fand weiter, dass sogar schon zwischen 80 und 90° die Harnstoffmoleküle in wässrigen Lösungen schnell gelockert werden. Ebenso wie das relativ kurz dauernde Erhitzen auf 80°, wirkt das discontinuirliche Erwärmen bei 60°, wenn diese Temperatur, wie es zum Erfolge erforderlich ist, 5 bis 6 Tage lang mindestens 1 Stunde lang einwirkt. Die Brütofentemperatur zwischen 30 und 40° wirkt dagegen nicht auf den Harnstoff. Trockener Harnstoff, der durch wiederholtes Umkrystallisiren aus dem unreinen käuflichen hergestellt wird, verträgt dagegen $^1/_2$stündiges Erhitzen auf 106°. Nach Leube verfährt man am besten so, dass man die für 200 cm der fertigen Lösung bestimmten Salze oder andere Nährmaterialien excl. des Harnstoffs in 150 ccm destillirten Wassers einträgt und diese Lösung für sich im Dampfe sterilisirt und abkühlen lässt. Dann wird die entsprechende vorher abgewogene Menge von trockenem Harnstoff in sterilisirtem Gefässe $^1/_2$ Stunde auf 106° erhitzt und nach dem Erkalten mit einem durch Glühen sterilisirten und wieder abgekühlten Platinspatel in 50 ccm vorher sterilisirtes, abgekühltes destillirtes Wasser eingetragen. Nachdem beide Lösungen für sich ganz fertig gestellt sind, wird die kalte sterile Harnstofflösung der abgekühlten sterilisirten Lösung der obigen Salze zugefügt und keine höhere Temperatur als die des Brütofens mehr angewendet.

Zum Widerlegen anderer Einwände, welche für die Existenz der Urzeugung geltend gemacht wurden, kann es wünschenswerth sein Substanzen zu verwenden, auf welche selbst nicht einmal diese niedrigen Temperaturen unter der Gerinnungstemperatur des Eiweisses

1) Mittheilungen aus dem K. Gesundheitsamte 1884, Bd. II, S. 330.

2) Ueber die ammoniakalische Harngährung. Virchow's Archiv 1885, Bd. 100, S. 540.

eingewirkt haben. Dies Ziel lässt sich in zwei Weisen erstreben, indem man einmal die Lösungen durch Filtration von etwaigen Beimengungen befreit oder indem man dieselben unzersetzt von Anfang an zu gewinnen versucht.

In erster Hinsicht hatte Helmholtz[1]) beobachtet, dass die Hefewirkung nicht durch Membranen hindurch wirkte, dagegen geschah dies bei der Fäulniss. Derartige Membranen waren also für diese Zwecke nicht brauchbar. Positive Resultate erhielt zuerst Tiegel[2]), indem es ihm gelang, durch **Filtration** septischer Flüssigkeiten durch Thonzellen **unter Anwendung positiven oder negativen Druckes** auf einer Seite die septischen Stoffe mechanisch von einer ganz wirkungslosen Flüssigkeit zu trennen.

Einen Filtrirapparat für Thon kann man sich in folgender, zuerst von Pasteur für seine Porzellancylinder angegebenen Weise improvisiren. Das offene Ende eines rissefreien Thoncylinders wird so dicht und fest mit Watte umwickelt, dass der Thoncylinder mit dem geschlossenen Ende nach unten mit der Watte wie ein Pfropf in einen etwas weiteren und längeren Glascylinder gepresst werden kann, dem Pasteur zum besseren Halt des Wattepfropfes oben eine leichte Verengerung gegeben hatte. Am unteren Ende, etwas über dem Boden, trägt der Glascylinder zwei seitliche Glasröhren, deren eine zugeschmolzen ist, während die andere offene mit einem Wattepfropf versehen wird. Der so hergerichtete Apparat wird durch trockene Hitze sterilisirt. Nach dem Erkalten wird nach Leube l. c. über das obere Ende eine Kautschukkappe gespannt, welche nur in der Mitte eine Oeffnung hat, um den Thoncylinder mit der zu filtrirenden Flüssigkeit füllen zu können. Diese Kautschukkappe schmiegt sich den Rändern des Glas- und Thoncylinders dicht an und schliesst so den Zwischenraum zwischen Glas- und Thoncylinder gegen die äussere Luft ab. Wird nun die offene untere und seit-

---

[1]) Ueber das Wesen der Fäulniss und Gährung. Müller's Archiv für Anatomie und Physiologie 1843, S. 453.

[2]) Correspondenzblatt für schweizer. Aerzte 1871, S. 275, und Ueber die fiebererregende Eigenschaft des Mikrosporon septicum. Dissert. Bern 1871.

liche Glasröhre des äusseren Glascylinders mit einem Aspirator verbunden, so presst sich die Kautschukmembran noch fester an und es entsteht eine Druckverminderung zwischen Glas- und Thoncylinder. Die im Thoncylinder befindliche Flüssigkeit tritt in Folge dieser Druckdifferenz zu beiden Seiten der Thonlamelle durch diese durch und sammelt sich allmählich am Boden des Glascylinders. Die Ueberfüllung aus dem letzteren erfolgt durch die bis dahin zugeschmolzene zweite Glasröhre. Pasteur hatte zuerst, statt durch Gummikappe, den Zwischenraum dadurch gegen die äussere Luft abzuschliessen versucht, dass er die den Zwischenraum füllende Watte mit einem guten Kitt überzog.

Pasteur und Joubert[1]) hatten milzbrandbacillenhaltiges Blut durch Filtration durch Gips unter Verdünnung der Luft von den Bakterien befreit. Die in Folge dessen in Frankreich wiederholt für Pasteur in Anspruch genommene Priorität der Methode ist aber entschieden unmotivirt, da das Prinzip bereits 1871 von Tiegel unter voller Würdigung der Bedeutung des Gegenstandes dargelegt und als ausführbar erwiesen war. Die Priorität der Methode gebührt Tiegel und dessen Lehrer Klebs, und Pasteur's Betheiligung beschränkt sich auf die Einführung eines anderen Materials. Später hat Pasteur statt Gips Bisquitporzellan und zwar als erster verwendet. Ueber die Form des Pasteur'schen Filters ist zuvor das Nöthige mitgetheilt.

Miquel und Benoist[2]) versuchten die Keime gleichfalls durch Gipsfilter zu entfernen.

Der Apparat, Fig. 16, besteht aus einem Ballon mit langem, im unteren Drittel ausgezogenen Halse. Unter der Verengerung wird an der Lampe eine 5 bis 6 cm lange Kapillare p ausgezogen. Ueber der Verengerung wird ein Asbestpfropf a angebracht und über diesen kommt eine 7 bis 8 cm hohe Schicht, f, von folgender Zusammensetzung:

Wasser	46
Modellir-Gips	52,4
Asbest	1,6

[1]) Comptes rendus 1877, Bd. 84, S. 900; Bd. 85, S. 101.
[2]) Bulletin de la Société Chimique de Paris 1881, Bd. 35, S. 552.

Der so präparirte Ballon wird ein bis zwei Wochen bei 40° getrocknet, darauf die Spitze p zugeschmolzen und dann der Apparat langsam auf eine Temperatur von 170 bis 180° gebracht. Zum Gebrauche befeuchtet man erst den Gipstampon f mit Wasser, wodurch die Luft aus den Poren verdrängt und die Verbindung mit dem Glase noch inniger wird. Die Verdünnung der Luft im Ballon A kann durch Aspiration bei p oder event. in folgender Weise ohne directe Aspiration geschehen. Die zugeschmolzene Spitze p taucht in sterilisirtes destillirtes Wasser und wird unter Wasser abgebrochen. Durch Erwärmen verdrängt man 40 bis 50 ccm Luft aus dem Ballon, welches durch das beim Erkalten eindringende gleiche Wasservolumen ersetzt wird. Dieses Wasser bringt man dann zum Kochen, so dass unter Entweichen des Dampfes aus der Spitze p in etwa 5 Minuten die grösste Menge Luft aus dem Apparate verdrängt und durch Dampf ersetzt ist. Wird dann die Spitze p wieder zugeschmolzen, so entsteht beim Erkalten in Folge der Condensation der Dämpfe eine starke Luftverdünnung im Ballon A, welche die über dem Gipstampon befindliche Flüssigkeit B durch denselben hindurch aspirirt.

Fig. 16.



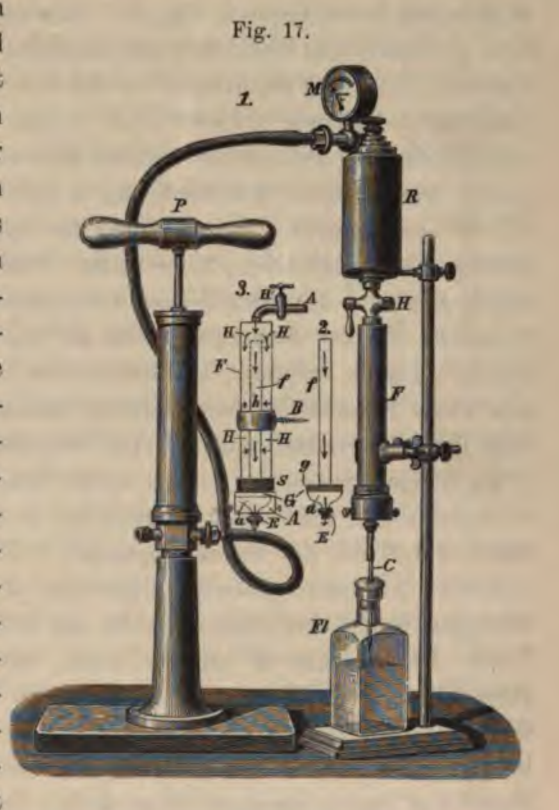
Gautier[1]) bediente sich sehr langhalsiger Flaschen von Fayence oder unglasirtem Porzellan, welche unten in einen Conus ausliefen. Durch diesen porösen Conus, das eigentliche Filter, soll die zu filtrirende Flüssigkeit von aussen nach innen in die Porzellanflasche eintreten. Zur Erzielung der Luftverdünnung befindet sich in dem Halse der Flasche, durch einen Mennigekitt befestigt, eine rechtwinkelig gebogene Glassröhre, deren einer Schenkel bis zum Boden des Conus hinabreicht, während das andere äussere Ende conisch verjüngt ausläuft und genau in eine entsprechende conische Erweiterung einer zweiten Glasröhre passt. Diese zweite Glasröhre ist gleichfalls rechtwinkelig gebogen und das eine Ende, welches später

---

1) Stérilisation à froid des liquides fermentescibles. Bulletin de la Société Chimique 1884. Bd. 42, S. 146.

mit dem rechtwinkelig gebogenen Theile der ersten Glasröhre verbunden wird, trägt eine conische Erweiterung, während das andere Ende bis auf den Boden eines Glaskolbens mit engem Halse reicht. Seitlich trägt dieser Glaskolben einen Ansatz mit einer conischen Erweiterung. Die beiden conischen Erweiterungen werden mit Watte geschlossen und dann dieser Glasballon mit Ansatz und mit der Glasröhre für sich sterilisirt. Ebenso wird die Porzellanflasche mit ihrer Glasröhre für sich erhitzt und dann unter Entfernung des einen Wattepfropfs der Conus der ersten Glasröhre in die conische Erweiterung der anderen eingefügt. In die conische Erweiterung des seitlichen Ansatzes des Glaskolbens wird unter Entfernung des Wattepfropfs eine entsprechend conisch auslaufende Glasröhre eingefügt, welche mit ausgeglühtem Asbest angefüllt ist. Die Verbindungen beider conischen Erweiterungen mit den entsprechenden conischen Verengerungen werden noch mit Schellack gedichtet. Durch Aspiration am freien Ende der Asbeströhre wird die Luft im ganzen Apparate verdünnt und wenn der Conus der Porzellanflasche in eine Flüssigkeit taucht, durch den entstandenen negativen Druck Flüssigkeit in die Porzellanflasche aspirirt, welche ganz keimfrei ist.

Fig. 17.



Der mit Terpentinöl bereitete, vielfach verwerthbare Mennigekitt besteht aus:

Krystallisirter Borsäure	8
Kieselsäure	2
Mennige	12.

Chamberland[1]) hat den Porzellanfiltern die bis jetzt praktischste Form gegeben, Fig. 17. Das eigentliche Filter, Nebenfigur 2, besteht aus einem oben geschlossenen, kerzenähnlichen hohlen Cylinder f von Bisquitporzellan, an den sich unten der aus glasirtem Porzellan bestehende breitere Theil a mit dem Mundstück E ansetzt; über dem Mundstücke befindet sich eine starke Gummiplatte g (G), deren centrale Durchbohrung so gross ist, dass der Cylinder f eben hindurchgeht. Dieser Theil des Apparates kommt dann in den äusseren metallischen, vernickelten Cylinder F der Nebenfigur 3; durch Anziehen des metallischen Verschlussstückes A des äusseren Cylinders auf der Schraube S wird die Gummiplatte G fest angedrückt. Durch Oeffnung des Hahnes H^1 tritt die Flüssigkeit in den Raum H zwischen dem äusseren metallischen Cylinder F und dem hohlen Porzellancylinder f. Ist der Druck der Flüssigkeit etwa 2 bis 3 Atmosphären, so genügt dieser Druck, um die Flüssigkeit, da kein anderes Entweichen möglich ist, in der Richtung der Pfeile durch die Wand des Porzellancylinders f in den Innenraum dieses Cylinders h hineinzupressen. Nebenfigur 3 giebt die für Wasserleitungen brauchbare Form, bei der die Befestigung an der Wand durch die Schraube B erreicht wird; für Laboratoriumsarbeiten empfiehlt sich die Form Hauptfigur 1, bei der die Flüssigkeit in das Reservoir R gebracht und der durch das Manometer M angezeigte Druck durch die Luftpumpe P erreicht wird. Der wunde Punkt bei der Anwendung liegt darin, dass an der Oeffnung E durch Luftinfection oder Manipulationen eine Infection der bis dahin keimfreien Filtrate eintreten kann; die Befestigung der Canüle C an das Mundstück erfordert desshalb die grösste Vorsicht. Der allgemeinen Verwerthbarkeit dieser schon recht handlichen Apparate

---

[1]) Comptes rendus de la Société de Biologie. Sitzung vom 4. August 1884 und vom 21. Februar 1885.

steht der Umstand entgegen, dass die Porzellanfilter, ebenso gut wie die Thonfilter oft feine Risse haben. Die Filter müssen sorgfältig mechanisch gereinigt und durch trockene Hitze von ca. 150 bis 160° sterilisirt werden; eine öftere Prüfung auf Risse ist unerlässlich. Auch von den Rissen abgesehen, werden die Poren der Filter bald mit Keimen angefüllt, so dass öfteres Reinigen und Sterilisiren der Porzellankerzen nöthig ist.

Neben den bisher angeführten Materialien verdienen Asbest und plastische Kohle noch eine besondere Berücksichtigung, doch sind die hiermit gemachten Versuche noch nicht so weit gediehen, um schon jetzt in Form eines universellen, für wissenschaftliche Arbeiten brauchbaren Apparates gebracht werden zu können; Vorversuche hat Hesse[1]) mitgetheilt. Die Sterilisation durch Filtration dürfte zur Lösnng vieler Fragen über krankheitserregende Organismen von Bedeutung werden. Für etwaige Versuche möchte ich noch auf folgende Punkte aufmerksam machen. Wir bedürften eigentlich zweier prinzipiell verschiedener Arten von Filter von gleicher technischer Vollkommenheit, einmal solcher, welche nur die Bakterien von den Flüssigkeiten scheiden, ohne die gelösten Stoffe irgendwie zu alteriren und dann solcher, welehe nicht nur die Bakterien, sondern auch die Ptomaine und Enzyme zurückhalten. Manche Differenzen sind sicher auf derartige differente Leistungen der Filter zurückzuführen. Flügge und Sirotinin[2]) haben nachgewiesen, dass Porzellanfilter anfangs auch Ptomaine und Enzyme zurückhalten und dieselben oft erst nach längerem Filtriren und bei Anwendung grösserer Mengen der ptomain- und enzymhaltigen Flüssigkeiten durchtreten lassen. Dies muss also beachtet werden, wenn man Ptomaine oder Enzyme von Bakterien durch Filtration trennen will.

Weiter ist aber auch darauf Rücksicht zu nehmen, dass die Enzyme auch von Bakterien oft nur in dem Maase in die Flüssigkeit übertreten, als die Ernährung der Bakterien es erfordert. In solchen Fällen sind die Flüssigkeiten arm an Enzymen und die lebenden Bakterien enthalten nur ein von den Zellen fester gebundenes

---

[1]) Deutsche med. Wochenschrift 1885, S. 71.

[2]) Zeitschrift f. Hygiene 1888.

Zymogen. Um dasselbe in das in den Flüssigkeiten lösliche Enzym überzuführen und dadurch eine an Enzymen reichere Lösung zu erhalten, muss man nach den Frfahrungen über die Verdauungs-Enzyme der höheren Thiere die Bakterienzellen in geeigneter Weise tödten. Dies kann man z. B. nach W. Kuehne[1]) dadurch erreichen, dass man durch Alkoholzusatz zur Flüssigkeit in derselben eine Fällung hervorruft, den Bodensatz mit absolutem Alkohol entwässert, darauf mit siedendem Aether einige Stunden extrahirt, trocknet und darauf mit sterilisirtem kaltem Wasser aufnimmt und nun erst nach 24 Stunden diese ev. die Enzyme enthaltende wässrige Lösung filtrirt.

Will man umgekehrt die Enzyme, welche übrigens noch nicht als chemische Individuen erwiesen sind, vom Filtrat fern halten, so muss man den von Flügge erkannten verzögernden Einfluss des Filtratmaterials steigern. Die Enzyme müssen wir als Abkömmlinge der Eiweisskörper und als Körper von hohem Molekulargewichte und in der Regel wenigstens als im Zustande der Colloïde oder der Micellarlösungen in den Flüssigkeiten befindlich annehmen. Derartige Körper werden aber besonders gut durch Kohle aus Lösungen absorbirt, wie Ad. Mayer[2]) zeigte. Wenn wir also den Hohlraum des Filters, Fig. 17 (3 H), mit gepulverter Kohle ausfüllen und auf diese Weise die Flüssigkeiten Kohle und Porzellanschicht passiren lassen, werden solche Filter höchst wahrscheinlich, mindestens in der gewöhnlichen Zeit, nur die in wirklicher Lösung befindlichen Körper passiren lassen, dagegen Körper von hohem Molekulargewichte, wie Farben, Ptomaine und Enzyme, absorbiren und ausserdem Bakterien als corpusculäre Elemente abfiltriren.

Viele auf diese Weise keimfrei gewordenen Filtrate haben keine tiefgreifenden Alterationen erfahren, aber manche derselben bleiben beim Filtriren nicht unverändert, weil die Filter nicht alle Stoffe gleich gut passiren lassen. Um auch diese Zweifel zu zerstreuen, muss man versuchen, **die Lösungen ganz unzersetzt, steril zu entnehmen durch Anwendung subtilster Reinlichkeit.**

---

[1]) Untersuchungen des physiologischen Instituts der Universität Heidelberg 1877, Bd. I, Heft 3.

[2]) Lehrbuch der Agrikulturchemie 1886, 3. Aufl., II, S. 87.

Soll das Material, welches auf Ab- oder Anwesenheit von Keimen geprüft wird, einem frisch getödteten Thiere entnommen werden, so können folgende Angaben als Anhalt für das Handeln dienen.

„Alle vorbereitenden Schnitte, welche die Impfsubstanz selbst nicht berühren, sind nach Koch[1]) mit heissen Instrumenten auszuführen, die Impfmasse aber mit abgekühlter Scheere und Pinzette herauszuschneiden" resp. mit abgekühlter Platinöse zu entnehmen. „Stets hat man mit geglühten Instrumenten zu operiren, welche jedesmal, wenn eine neue Schicht bloszulegen ist, gewechselt werden. Der stete Wechsel der Instrumente ist nothwendig, damit Verunreinigungen, welche sich beim Durchschneiden der Haut und der oberflächlichen Schichten den Instrumenten anhängen, nicht in die Kulturen verschleppt werden."

Mit Rücksicht auf diese Ermittelungen gestaltet sich das Vorgehen derart, dass nach Aufspannen oder Aufnageln des Thieres auf ein Secirbrett, das Fell, soweit der Schnitt ausgeführt werden soll, in gehöriger Ausdehnung mit 1 p. M. Sublimatlösung gründlich angefeuchtet wird, um beim Anfassen und Einschneiden ein Verstäuben von Schmutz, Haaren etc. möglichst zu vermeiden; Mäuse befestigt man auf ein kleines Brett, indem man durch die angespannten Füsse Nadeln sticht und event. noch mit einer 5. Nadel durch das Maul den Kopf fixirt. Bisweilen ist es gut, die Haare oder Federn auf eine grössere Strecke möglichst zu entfernen und dann erst die blosgelegte Strecke mit Bürste und Seife und darauf mit Sublimatlösung zu reinigen. Eine Anzahl Messer, Scheeren, Pinzetten werden vorher in den Flammen ausgeglüht oder bei 150° sterilisirt und unter einer Glocke, gegen Berührung und Staub geschützt, nieder gelegt. Die gebrauchten Instrumente werden sofort in Karbolsäure oder Kresollösungen gelegt, und nach dem Versuche sorgfältig gereinigt, getrocknet und event. noch durch die Flamme gezogen. Dann wird die Haut in entsprechender Ausdehnung, bei grösseren Thieren mit noch heissem Skalpell, bei kleineren mit heisser Pinzette und Scheere durchschnitten und auf beiden Seiten so weit zurückgelegt, um frei weiter operiren zu können.

---

1) Mittheilungen Bd. II, 1884, S. 50.

Mit einer zweiten heissen Pinzette oder Scheere wird nun, wenn die Entnahme an der Pleura oder Lungenoberfläche stattfinden soll, ein 1 bis 2 qcm grosses Fenster aus der Brustwand herausgeschnitten und dadurch die Oberfläche der Lunge blosgelegt. Um Pleuraflüssigkeit zu entnehmen, kann man nach Salomonsen[1]) die blosgelegte Pleura in einem Intercostalraume mit heissem Glasstabe kauterisiren und durch den Schorf mit sterilisirter Capillarröhre, Nadel, Platinöse oder Messer in die Pleura eindringen.

Soll ein Organ aus der Bauchhöhle gewählt werden, so wird dasselbe, bei derselben Art der Eröffnung der Bauchhöhle, mit geglühten Instrumenten herausgenommen, auf einen reinen Untersatz oder Fliesspapier gelegt und dann nur die bindegewebige Umhüllung mit heissem Messer eingeschnitten; darauf fasst man die Ränder mit zwei abgekühlten Pinzetten und reisst das Organ tief ein, dann entnimmt man mit Platinöse aus der Tiefe des Risses Gewebssaft oder Gewebspartikel. Zur schnellen Entfernung der Milz legt man das Thier auf die rechte Seite, so dass die Milz sofort bequem vorliegt und ein längeres Manipuliren mit den benachbarten Organen wegfällt. Selbstverständlich kann man auch hier eine oberflächliche Kauterisation mit heissem Glasstabe oder Paquelin'schem Brenner dem Eindringen in das Gewebe vorausgehen lassen.

Bei oberflächlich gelegenen Lymphdrüsen schneidet man die Haut wieder in derselben Weise durch, fasst dann die Drüse mit abgekühlten Instrumenten und schneidet sie in situ durch zur Entnahme aus dem Innern; oder man löst sie aus der Umgebung, legt sie auf eine vorher geglühte und wieder abgekühlte Glasplatte, schneidet oder reisst sie ein und entnimmt aus dem Innern Saft oder Gewebspartikel.

Soll Blut aus dem Herzen entnommen werden, so wird, nachdem die Haut ebenso durchschnitten ist, der Brustkorb mit heisser Pinzette und heissem Messer resp. Scheere über dem Herzen geöffnet, so dass das Herz mit seinem Pericardium freigelegt wird, ohne dass der Inhalt der Bauchhöhle mit den Instrumenten in Berührung kommt. Dann wird das Pericardium mit frischen Instru-

---

[1]) Bakteriologisk Teknik 1885, S. 60.

menten geöffnet. Darauf fasst man die Herzspitze mit abgekühlter Pinzette und öffnet mit abgekühltem Skalpell eine Herzhöhle, aus der man mit abgekühlter Platinöse oder Capillarröhre das zu übertragende Blut entnimmt.

Will man bei kleinen Thieren Blut während des Lebens direct den Gefässen entnehmen, ohne dass mit dem Blute Luft zutreten konnte, so verfährt man nach Salomonsen vortheilhaft in der Art, Abbildung 1, Fig. 18, dass man das ausgezogenene, zugeschmolzene Ende einer sterilisirten Glasröhre, welche man unmittelbar vor dem Gebrauche noch einmal durch die Flamme zieht, in das unter antiseptischen Kautelen blosgelegte und geöffnete Gefäss einbringt und, nachdem erst etwas Blut neben der Röhre ausgeflossen ist, bei b auf die Röhre festbindet. Dann zerbricht man bei f das ausgezogene Ende innerhalb des Gefässes und füllt durch Saugen oder Aspiriren mit einer Gummikappe [cf. Abschnitt über das Inficiren, Fig. 29 (2)] am entgegen gesetzten Ende, welches durch sterilisirte Watte oder Asbest geschlossen ist, die Röhre mit Blut. Darauf legt man die Ligaturen a, c und d, schneidet zwischen a und b, und zwischen c und d durch und schmilzt an der Flamme unterhalb b zu. An dieser Seite konnte zu keiner Zeit des Füllens Luft zutreten, und an der anderen Seite kann nur filtrirte Luft zutreten. Die Röhrchen kommen dann in Thermostate bei Bluttemperatur.

Fig. 18.



Bei grösseren Thieren (Pferde, Rinder, Ochsen, Kälber, Schafe) verfährt man nach Nocard und Roux[1]) am besten derart, dass man die v. jugularis durch Druck zum Schwellen bringt. Ueber der bestimmten Stelle entfernt man die Haare, brennt die Haut mit roth glühendem Eisen, sticht durch

1) Annales de l'Institut Pasteur 1887, I, S. 20.

den Schorf mit sterilisirtem Trocart die Vene an und führt durch diese Oeffnung die vorher noch einmal durch die Flamme gezogene Glasröhre in die Vene ein und füllt das Gefäss durch Saugen mit Blut an.

Wenn Blut bei Menschen intra vitam entnommen werden soll, so kann man bei Gelegenheit eines Aderlasses Tropfen Blut aus einer Hautvene mit Platinöse entnehmen. Am einfachsten ist es, eine Hautstelle von den Haaren zu befreien, die Stelle mit Bürste und Seife zu reinigen, dann mit 1 p. M. Sublimatlösung abzuwaschen, mit Alkohol und endlich mit Aether die letzten Spuren Sublimat zu entfernen. Dann sticht man mit sterilisirter Nadel ein oder macht mit sterilisirtem Messer einen leichten Schnitt, nimmt die ersten vorquellenden Tropfen mit Platinnadel weg und braucht die später vorquellenden Tropfen zum Impfen.

Um etwas mehr Blut zu erhalten, kann man nach Scheuerlen[1]) die Salomonsen'schen Röhren derart benützen, dass man ca. 7 mm weite, nicht zu dünnwandige Röhrchen von 15 bis 20 cm Länge an einem Ende spitz auszieht und zuschmilzt, während das andere, unterhalb der Stelle, bis zu welcher der Wattepfropf reicht, etwas ausgezogen wird. Unmittelbar vor der Blutentnahme wird das zugeschmolzene Ende mit geglühter Scheere abgeschnitten und dann wird sofort die Spitze durch die vorher gründlich gereinigte und desinficirte Hand unter leicht bohrender Bewegung in eine oberflächliche Vene eingeführt. Das Röhrchen wird dabei der Körperoberfläche möglichst parallel und dem venösen Blutlauf entgegengesetzt gehalten. Das Röhrchen füllt sich meist schnell ohne Saugen. Zum Saugen ist in diesen Fällen eine Gummikappe nach Th. Smith[2]) zu empfehlen, weil sie nach dem Füllen das Reguliren der Blutmenge derart gestattet, dass man das Ende des Röhrchens besser wieder schliessen kann; nach dem Füllen kann ausserdem das Röhrchen an der oberen Verengerung abgeschmolzen werden, so dass man nach Wunsch Luft zutreten lassen oder ausschliessen kann. Zum Einstich empfehlen sich Venen des Handrückens nach mässiger

---

1) Centralblatt f. Bakteriologie 1890, VIII, No. 9.

2) Ibid. 1891, IX, No. 2 und First Annual report of the Bureau of Animal Industry 1885, S. 240.

Abschnürung der herabhängenden Gliedmaasse, oft genügt sogar centrale Venencompression oder das Herabhängen des Gliedes; nur bei Frauen muss man stets abschnüren.

Zahn[1]) nahm statt solcher Glasröhren nach Salomonsen Pipetten von 50 bis 300 ccm Inhalt, deren einzuführendes Ende spitz ausgezogen und deren anderes Ende vorläufig an einer Stelle verjüngt wurde. Dann wurde der Ballon der Pipette auf dem Wasserbade oder in der freien Flamme stark erhitzt, während des Erhitzens vielfach die Luft noch ausserdem durch Sauerstoff, Kohlensäure oder Wasserstoff verdrängt, und während des Erhitzens und Durchleitens der Gase sowohl das ausgezogene Ende als die verjüngte Stelle zugeschmolzen. Das Sterilisiren geschah durch hohe Temperatur. Da die Luft in der Pipette durch das Erhitzen verdünnt war, erfolgte nach Abbrechen der Spitze im Gefässe die Füllung in Folge des im Inneren herrschenden negativen Druckes. Beim nachherigen Zuschmelzen können, nach Zahn, sich bisweilen feine Risse einstellen, worauf man sorgfältig zu achten hat. Ich überziehe diese Stellen unmittelbar nach dem Abschmelzen sofort mit einer Kuppe von Siegellack.

Auch die von Chamberland eingeführten Kölbchen kann man zur Entnahme von Blut aus einer blosgelegten Arterie oder Vene oder aus dem Herzen benutzen, wenn dasselbe keine Zersetzung erfahren soll. Diese Kölbchen A, Fig. 10 (4), S. 204, haben einen Hals a, der mit Wattepfropf versehen ist, und die spitz ausgezogene Capillare b. Dieselben werden durch Hitze sterilisirt und das Ende der Capillare kurz vor dem Gebrauche durch Abbrechen oder Abschneiden geöffnet und noch einmal in der Flamme erhitzt und dann schnell in das Gefäss oder das Herz eingeführt; durch Saugen am Halse a kann man das Füllen beschleunigen; nach dem Füllen wird

Fig. 19.



[1]) Untersuchungen über das Vorkommen von Fäulnisskeimen im Blut gesunder Thiere. Arch f. pathol. Anatomie 1884, Bd CXXXXV, S 401.

die Spitze von b an der Flamme zugeschmolzen, so dass durch den Pfropf a nur filtrirte Luft zutreten kann. Eine etwas bessere Form dieser Kolben stellt Fig. 19 dar, für welche sonst dasselbe gilt, wie für die Figur 10. K ist der Kolben, h das mit Wattepfropf w verschlossene zum Saugen bestimmte Ende und a das zum Einführen in das Herz oder Gefäss dienende capillar ausgezogene Röhrchen.

Stammt das Blut von gesunden Thieren, so trennt sich der Blutkuchen von dem Blutserum; auf dem letzteren bildet sich bisweilen ein feines Häutchen aus feinsten Fetttröpfchen und veränderten Blutplättchen. Die zelligen Elemente verfallen allmählich einer regressiven Metamorphose, die Granulationen treten aus, aber das sind keine Kokken! Wirkliche Bakterien treten nicht auf und die im Blute nach Salomonsen sich so charakteristisch entwickelnden Fäulnissflecke bleiben aus und doch sind derartige Blut-Granula sowohl direct als Bakterien aufgefasst, als auch als Bakterien durch Anamorphose des Protoplasma erklärt worden.

Zur Entnahme von Milch bedarf es ebenfalls grösster Reinlichkeit; man muss die Milchdrüsen äusserlich desinficiren, dann sterilisirte Glasröhrchen in den Ausführungsgang der Drüse einführen und, nachdem etwas Milch unbenutzt vorbeigeflossen ist, die Milch direct in die sterilisirten Gefässe durch leichten Druck auf die Drüse einfüllen.

Frische Eier werden nach meinen Beobachtungen [1]) am besten sorgfältig gereinigt, dann wird die Schale mit Sublimatlösung sterilisirt, darauf mit sterilisirtem Wasser abgespült und dann werden die Eier mit steriler Watte abgetrocknet. In diesem Zustande können die ganzen Eier verwendet werden. Will man den Inhalt ganz, oder Eigelb und Eiweiss gesondert prüfen oder zu Kulturzwecken verwenden, so wird die Schale mit geglühtem Messer aufgeschlagen und der Inhalt sorgfältig in sterilisirte Gefässe übertragen. Nach Gayon sollen allerdings alle Eier Keime enthalten. Nach meinen Beobachtungen ist dies nicht ganz zutreffend und das sterile, nicht gekochte Ei ist für viele Mikroorganismen ein ausgezeichneter

---

[1]) Centralblatt für Bakteriologie 1888, Bd. IV, No. 3.

Nährboden, während es andererseits für andere Arten ganz ungeeignet zu sein scheint.

Bei vorsichtiger, reinlicher Entnahme erfolgt weder aus unorganisirter Materie, noch aus „Stickstoffsplittern", noch aus Mikrozymen, noch aus den Zellgranula oder durch „Anamorphose des Protoplasma" die Bildung irgend eines Organismus, nicht einmal eines Kokkus, was allerdings viele Autoren nicht abgehalten hat, Molecularbewegung zeigende Körper differenter Herkunft für ächte Kokken anzusprechen, aus denen sich dann später auch Bacillen etc. entwickeln sollten. Die zur Ausführung dieser Versuche erforderliche technische Fertigkeit ist nur durch viele Einzelversuche zu erreichen. Die bisherigen negativen Erfolge waren bis auf einige die Regel nur bestätigende, sichere Ausnahmen, z. B. von Klebs und Wyssokowitsch, nachweislich nur durch ungenügende Technik erreicht, weshalb derartige Aeusserungen von Befunden von Organismen in den gesunden Säften, von Bildung von Mikroorganismen aus unorganischer Materie, aus Mikrozymen, aus dem Protoplasma durch eine „Anamorphose" desselben die schärfste Kritik und vor Allem die noch schwerere Selbstkritik erfordern.

Keimfreie Räume, in welchen **die Luftinfection,** welche wir jetzt nicht mehr so sehr und ausschliesslich wie früher fürchten, fast **unmöglich** gemacht ist, erhält man nach H. Buchner, Fitz und Tyndall leicht dadurch, dass man mit Glasscheiben versehene Holzkasten nach Art der zur Aufnahme der Wagen bestimmten anwendet, welche vor dem Gebrauche innen und aussen gründlich mit Wasser angefeuchtet werden, so dass kein Stäuben möglich ist. Auch eine auf- und abbewegbare Glocke kann gute Dienste leisten.

Unumgänglich nöthig sind von anderen Apparaten noch **Brütöfen, Vegetationskasten** oder **Thermostaten.** Grosse Laboratorien, welche über die erforderlichen Mittel und Räume verfügen, werden gut thun, sich nach Pasteur's Vorgang ein ganzes Zimmer direct als Brütraum einzurichten. Sonst ist es wenigstens gut, die Thermostaten in Räumen unterzubringen, welche möglichst gegen Temperaturschwankungen gesichert sind.

Im Nothfalle kann man jeden Topf zum Thermostaten einrichten, wenn man ihn mit einem Thermoregulator versieht und gegen

Wärmeverluste schützt und für manche Fälle, z. B. beim Arbeiten mit grossen Kolben, ist dieses primitive Verfahren, wenn man den Kolben mit doppelt durchbohrtem Gummipfropf versieht, der in der einen Durchbohrung das Thermometer, in der anderen den Thermoregulator aufnimmt, auch sehr genau. Im Allgemeinen ist man aber genöthigt, sich mit einem zur Aufnahme von mehreren Gegenständen geeigneten Thermostaten zu versehen.

Eine einfache Form, welche jeder Klempner herstellen kann, stellt Fig. 20 dar. Dieser Apparat ist aus Eisenblech angefertigt und hat eine doppelte Wandung zur Aufnahme von Wasser; zum Schutze gegen Wärmeverlust dient eine Umkleidung von Filz oder Asbest oder man giebt dem Kasten noch eine dritte Wandung und füllt diesen zweiten Zwischenraum mit einer Schicht von Kieselguhr. Die Dimensionen richten sich nach dem Bedarf; die Form, viereckig oder cylindrisch, ist ziemlich gleichgültig; statt des Deckels kann zum Einbringen der Gegenstände auch eine vordere Thüre vorhandensein. Bei den viereckigen ist eine innere Höhe und Breite von 25 ccm zu einer Länge von 50—75 ccm meist ausreichend. Zur Regulirung der Temperatur dienen Thermometer t und Thermoregulatoren r. Gut ist es, einen Gasdruckregulator zwischen die Hauptleitung und den Brütofen einzuschalten. Die Erwärmung geschieht in der S. 200 angegebenen Weise durch Petroleumlampen oder Gas.

Fig. 20.



Für genaue Bestimmungen ist der *Thermostat nach d'Arsonval*, Fig. 21, sehr beliebt. Derselbe besteht aus einem doppelwandigen Cylinder von starkem Kupferblech, welcher unten in der doppelwandigen conischen Heizfläche endigt. Der geneigte Abschluss des Cylinders von M^1 nach M gestattet die Beseitigung aller Luft und vollständige Füllung des ganzen Mantels W mit Wasser. Man füllt den Mantel mit destillirtem oder Regenwasser von einer der gewünschten annähernd gleichen Temperatur vollständig bis M^1, setzt

dann die Steigröhre S auf, in der das Wasser eine bestimmte Höhe einnimmt. Das durch einen Druckregulator von dem Druck in der übrigen Leitung unabhängige Gas strömt bei a ein, tritt durch die Oeffnung a^1 in die kleine Kammer h, von hier bei b wieder aus und gelangt von b durch eine Rohrverbindung nach c und dann zu den Flammen d. Diese werden durch einen Mantel von Marienglas gegen Zug geschützt und können als Stichflammen nicht zurückschlagen. Zwischen dem Raume h und dem Wassermantel W ist ein Schlösing'scher Membran-Regulator m—m eingespannt. Bei Temperaturschwankungen des im Wassermantel W sich befindenden Wassers macht sich die Zusammenziehung oder Ausdehnung der grossen Wassermenge in der engen Steigröhre durch relativ starkes Fallen oder Steigen bemerkbar. Dadurch ändert sich aber der auf dem Wasser lastende Druck relativ stark und die Kautschukmembran m—m wird entsprechend bald mehr nach dem Wasser vorgebaucht, bald der Ausströmungsöffnung des Gases a^1 fester aufgedrückt. Es strömt dementsprechend bald mehr Gas durch a^1 in den Raum h ein, bald weniger, und in Folge dessen brennen die Flammen bald stärker resp. schwächer, bis die Temperatur wieder erreicht ist, auf welche der Apparat eingestellt war. Die Regulirung ist auf Zehntel eines Grades innerhalb mehrerer Wochen genau, wenn der Stand des Wassers in der Steigröhre täglich controllirt und durch Nachfüllen einiger Tropfen destillirten Wassers oder Wegnahme einiger Tropfen regulirt wird, wenn der Gasdruck durch Einschalten eines Gasdruckregulators vom Gasdruck der Hausleitung unabhängig ist und wenn der Raum, in dem der Apparat steht, eine ziemlich gleichmässige Temperatur besitzt. Zur Vermeidung unnöthigen Wärmeverlustes ist es nöthig, den Apparat noch mit einem Filz- oder Asbestmantel zu umgeben.

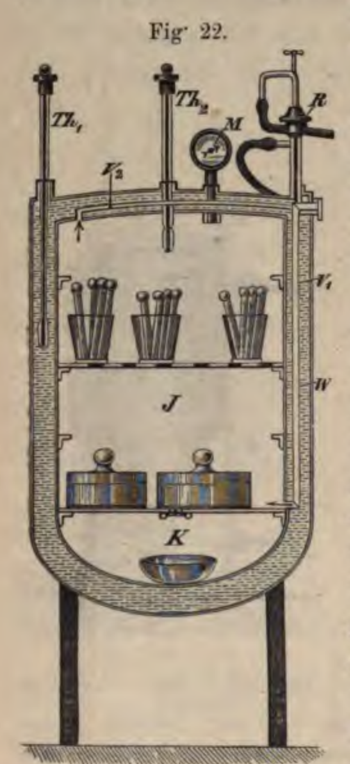
Fig. 21.



Einen etwas anderen Membran-Regulator verwendet Desaga-Heidelberg, der ebenfalls recht gut ist.

Rohrbeck[1]) giebt dem Apparate eine ovale Form, Fig. 22, um todte Ecken zu vermeiden. Derselbe ist mit Ventilation, V_1 und V_2, versehen und mit Thermometern Th_1 für den Wassermantel W und Th_2 für den Innenraum J und ausserdem mit Manometer ausgestattet. Zur Wärmeregulation dient ein Thermoregulator mit Dampftension R. Der Raum K kann mit dem eigentlichen Arbeitsraume J in Verbindung gesetzt werden und eine eingesetzte Schale mit Wasser kann für Feuchtigkeit der Kammern sorgen, wenn dies gewünscht wird.

Fig. 22.



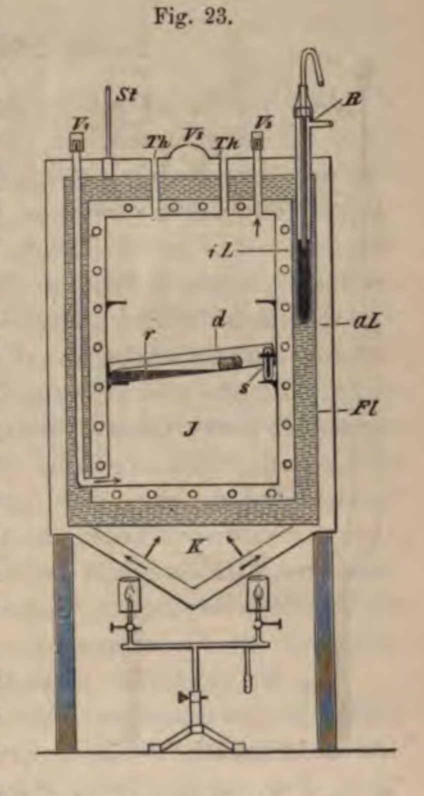
Ich[2]) hatte, um einen sehr genauen und doch relativ billigen Thermostaten zu erzielen, die erwärmte Luft mit zur Erwärmung der Flüssigkeit verwendet. Da dieses Prinzip sich gut bewährt hatte, ging Muencke auf meinen Wunsch dazu über, das Prinzip unter Vereinfachung des ganzen Apparates in einem neuen Thermostaten einzuführen, der gleichzeitig mit dem Rohrbeck'schen Apparate herauskam; Fig. 23. Die Flüssigkeit wird nicht direct von der Flamme erhitzt, sondern allseitig von der erwärmten Luft des unteren Raumes K und des seitlichen und oberen Raumes aL erwärmt. Dieser warme Luftmantel kann durch eine Firstventilation V_3 leicht regulirt werden. Die Ventilation des Innenraumes erfolgt durch V_1 und V_2. Der Innenraum J selbst ist auch innen durch eine iso-

[1]) Centralblatt für Bakteriologie 1887, II, No. 3.

[2]) Deutsche med. Wochenschrift 1886, No. 17; Centralblatt für Bakteriologie 1887, I, No. 20.

lirende Luftschicht i L gegen den directen Einfluss der Flüssigkeitstemperatur geschützt. Dann haben wir die sehr bequeme Einrichtung getroffen, dass die Einsätze d durch Stellschrauben s stellbar sind, so dass man einen besonderen Apparat zum Schieflegen erpart, wie das schiefgelegte Reagirglas r zeigt. Der Apparat wird als einfacher oder als Doppelapparat ausgeführt; bei der kleineren Form wird auf Wunsch eine isolirt heizbare Thüre angebracht, um ihn noch exacter zu gestalten. Zur Wärmeregulirung dient am besten ein Tensionsthermoregulator R. Dieser Apparat leistet dasselbe wie der von Rohrbeck und d'Arsonval und ist relativ billig.

Fig. 23.



Die Flüssigkeit muss überall dasselbe Metall treffen, um das Entstehen von Strömen zu vermeiden. Die Thermoregulatoren müssen stets in der Flüssigkeit stehen. Als Flüssigkeit verwendet man entweder Wasser (Regenwasser) oder das in der Gasindustrie zum Füllen der Gasometer verwendete verdünnte Glycerin.

Ausser diesen 3 zur Zeit besten und verbreitetsten Thermostaten sind noch viele andere im Gebrauch, z. B. von Schottelius[1]), Babes[2]), Vignal[3]), Abel[4]), welche gegebenen Falls wohl auch ausreichen werden. Zum Bezuge der angeführten Apparate wende man sich an die Firmen: Kaehler und Martini-Berlin, Muencke-

[1]) Centralblatt für Bakteriologie 1887, Bd. II, No. 4.

[2]) Centralblatt für Bakteriologie 1888, IV, No. 1.

[3]) Annales de l'Institut Pasteur 1887, I, S. 185.

[4]) Centralblatt für Bakteriologie 1889, V, No. 21.

Berlin, Rohrbeck-Berlin, Wiesnegg-Paris, Lautenschläger-Berlin, Desaga-Heidelberg und für die Sterilisirungs-Apparate mit gespanntem Dampf besonders an Stollnreuther-München.

---

2. Die Nährsubstrate.

Bakterienvegetationen werden spontan in Flüssigkeiten und auf festen Substraten beobachtet. Die ersten Experimente wurden bei dem zunächst gegebenen Ausgangspunkte von Infusionen und gährungsfähigen Flüssigkeiten vorwiegend mit Flüssigkeiten angestellt. Nachdem man einmal auf den Einfluss der zersetzungsfähigen Körper aufmerksam geworden war und eine Abhängigkeit der Bakterienvegetation vom Nährboden kennen gelernt hatte, führten diese Beobachtungen dazu, solche **Flüssigkeiten** zu wählen, welche möglichst vielen Arten annähernd gleich günstige Bedingungen bieten sollten. Solche **universell verwerthbare Lösungen** bezeichnete man oft als Normallösungen im Gegensatze zu den prinzipiell anders gewählten Lösungen, welche einem ganz speziellen Zwecke dienen sollten. Man variirte demgemäss zweitens die Lösungen derart, dass sie für einen **concreten Fall** die relativ besten wurden, in der Hoffnung, dass in einer solchen Lösung im Gegensatz zu den Normallösungen eine bestimmte Art alle übrigen unterdrücken würde.

Von den künstlichen Normallösungen für die Bakterien ist die älteste die „Pasteur'sche Flüssigkeit“ [1]), welche aus 1 Theil weinsaurem Ammoniak, 10 Theilen Kandiszucker und der Asche von einem Theile Hefe auf 100 Theile Wasser besteht.

A. Mayer [2]) wandte statt der Hefenasche eine Lösung der in der Hefenasche enthaltenen Salze an. Cohn [3]) gewann dann, indem

---

1) Annales de Chimie et de Physique, Bd. 58, S. 323, deutsch von Griessmayer: Die Alhohol-Gährung 1878.

2) Unters. über die alkohol. Gährung 1869, Lehrbuch der Gährungs-Chemie, 3. Aufl., 1879.

3) Beiträge zur Biologie der Pflanzen I, 2. Heft, S. 195.

er diese Mayer'sche Normallösung der mineralischen Nährsalze benutzte und den Zucker wegliess, folgende „normale Bakteriennährflüssigkeit“:

0,5 gr phorphorsaures Kali, 0,5 gr krystallisirte schwefelsaure Magnesia, 0,05 gr dreibasisch phosphorsaurer Kalk auf 100 ccm destillirtes Wasser; hierin wurde 1,0 gr weinsaures Ammoniak aufgelöst. Bei der Verwendung dieser Lösung zu Kulturen des bakterium termo zog Cohn nur den einen allgemeinen Schluss, dass die Bakterien wie die grünen Pflanzen und im Gegensatze zu den Thieren den Stickstoff in Form von Ammoniakverbindungen assimiliren können, während sie den Kohlenstoff nicht aus Kohlensäure zu entnehmen vermögen. Eine Verallgemeinerung für alle Bakterien vermied Cohn.

Naegeli[1]) ermittelte für die niederen Pilze und die Spaltpilze, dass der Stickstoff am besten assimilirt werden kann, wenn er als NH_2, weniger leicht, wenn er als NH, noch schlechter, wenn er als NO vorhanden ist und gar nicht, wenn er mit anderen Elementen als H und O verbunden ist, so dass sich von den löslichen Albuminaten bis zu Ammoniak und Salpetersäure eine absteigende Skala construiren lässt. Für den Kohlenstoff stellte er folgende Skala auf:

1. die Zuckerarten;
2. Mannit; Glycerin; die Kohlenstoffgruppe im Leucin;
3. Weinsäure; Citronensäure; Bernsteinsäure; die Kohlenstoffgruppe im Asparagin;
4. Essigsäure; Aethylalkohol; Chinasäure;
5. Benzoësäure; Salicylsäure; die Kohlenstoffgruppe im Propylamin;
6. die Kohlenstoffgruppe im Methylamin; Phenol.

Für die Assimilationsfähigkeit der vereinigten Stickstoff- und Kohlenstoffquellen stellte Naegeli folgende, von den besser zu den schlechter nährenden Substanzen fortschreitende Stufenreihe auf:

---

[1]) Ernährung der niederen Pilze durch Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen. Untersuchungen über niedere Pilze, 1882, S. 1.

1. [illegible]
2. [illegible]
3. [illegible] Ammoniak [illegible]
4. [illegible]
5. [illegible]
6. [illegible] Ammoniak [illegible]
7. [illegible] Ammoniak

[illegible]

[illegible]

1. Wasser [illegible]
2. Wasser [illegible]
3. [illegible] Ammoniak [illegible]

[illegible]

[illegible] Lösungen [illegible] Lösungen [illegible] ent- [illegible]

werden. R. Warington[1]) hat gezeigt, dass man einen häufigen Grund zu den Ausfällungen, welche sich bei gleichzeitigem Lösen aller Salze einstellen, vermeiden kann, wenn man das Magnesiumsulfat für sich allein in etwa der Hälfte Wasser löst und die übrigen Salze in der anderen Hälfte und wenn man diese beiden gesondert bereiteten Lösungen dann erst sorgfältig mischt.

Es ist nicht nöthig, oft geradezu schädlich, wenn man die ausgeschiedenen Salze durch Filtration entfernt, da ein Theil derselben durch die Bakterien im Verlaufe ihrer Vermehrung wieder in Lösung übergeführt wird.

Statt der Verwendung von Dikaliumphosphat zur Herstellung von neutralen Lösungen ist es für Fälle, in denen dauernd neutrale Reaction herrschen soll, in der Regel viel bequemer, saures Phosphat zu nehmen, aber der Lösung je nach der Menge derselben, eine Spur bis zu einer Messerspitze fein gepulverten kohlensauren Kalk (ev. auch in bestimmten Fällen schwefelsaueren Kalk) zuzusetzen, welcher etwaige Säuren in dem Maasse ihrer Bildung sofort neutralisit.

Die bisherigen Erfahrungen mit diesen Normallösungen haben schon gelehrt, dass dieselben durchaus nicht so universell verwerthbar sind, wie man es früher gehofft hatte.

Statt der Nährsalze kann man sehr oft bequemer 0,1 % Fleischextract anwenden. Für die Gährungsversuche resultiren daraus, nach Fitz[2]) Lösungen aus 3 % Zucker oder Mannit, Glycerin etc. und 0,1 % Fleischextract, denen in der Regel zum Binden der entstehenden Säuren eine geringe Menge von reinem Calciumcarbonat zugesetzt wird. Bei diesen Lösungen wird schon einem concreten Falle mehr Rechnung getragen als bei den Normallösungen.

Nach den bisherigen Erfahrungen über Kulturen in Flüssigkeiten wird man gut thun, die Nährflüssigkeiten mit besonderer Rücksicht auf den **concreten Fall** zu wählen. Dies muss geschehen, wenn man die Lösungen benutzen will, um eine bestimmte Art, z. B.

---

[1]) Journal of the chemical Society 1884, S 642.

[2]) Ueber Spaltpilzgährungen VII Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 1882, XV, S. 867.

Fermentbakterien, aus einem Gemische mit anderen Arten zu isoliren. In Ermangelung anderer Anhaltspunkte wählt man, wie in den ersten Versuchen von Pasteur, zum Ausgang die Flüssigkeit, in welcher die Bakterien spontan beobachtet wurden. Für Mikroorganismen, welche auf festen Substraten beobachtet wurden, stellt man sich Decocte oder Infuse aus diesem Substrate her, von frischem Mist, von süssen, getrockneten Früchten, Heu, Wurzeln u. s. w.

„Eine Nährlösung, welche diejenigen Substanzen gelöst enthält, die in einem festen Substrate, worauf ein Pilz in der Natur vorkommt, sich finden, wird nach Brefeld[1]) auch mit aller Wahrscheinlichkeit ein geeignetes Substrat für die Entwicklung des Pilzes abgeben.“ Die Lösungen werden für Pilze meist schwach sauer gehalten, für Bakterien in der Regel durch Ammoniak, Dinatriumphosphat oder Natrium-Carbonat neutralisirt oder schwach alkalisch gemacht, aufgekocht und filtrirt. Das Sterilisiren kann durch Kochen, durch strömende und gespannte Dämpfe erfolgen; die saueren Lösungen sind im Allgemeinen schneller steril zu machen als die alkalischen.

„Mit der Anwendung klarer, pilzfreier Nährlösungen, in welchen sich die Untersuchungen der Pilze durch directe Beobachtung mit derselben Leichtigkeit ausführen lassen, als ob sie in dem durchsichtigen Wasser lebten, wird die mykologische Untersuchung gleichsam in eine algologische umgewandelt, d. h. es sind mit den Nährlösungen die Bedingungen für die Entwicklung der Pilze künstlich hergestellt, unter welchen wir die Algen, die meistens das Wasser bewohnen, ohne weiteres natürlich antreffen.“

Mit diesen Worten von Brefeld (l. c. S. 7) ist der Hauptvortheil der Nährlösungen auch für Bakterienculturen treffend gekennzeichnet.

Handelt es sich nicht darum, eine bestimmte Art aus einem Gemische mit anderen Arten zu isoliren, sondern will man ermitteln, wie viel verschiedene Arten in einem ganz unbekannten Gemische, z. B.

---

1) Kulturmethoden zur Untersuchung der Pilze. Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze, Heft IV. 1881, S. 5.

in Erde, Luft, Wasser, sind, oder wie viel entwicklungsfähige Keime irgend ein Substrat enthält, so bedarf man trotz aller Erfahrungen, nach denen es keine Lösung giebt, welche allen Arten gleich gute Bedingungen gewährt, einer **möglichst universell verwerthbaren Lösung.** Diesem Ideal kommt eine richtig bereitete Fleischbrühe recht nahe. Miquel[1]) empfiehlt folgende Lösungen:

1. 50 gr Liebig'sches Fleischextract in 1 Liter Wasser gelöst, heiss mit Natronlauge neutralisirt, gekocht, filtrirt; dann bei 110° sterilisirt hat diese Lösung bei 18° ein sp. Gewicht von 1,024.
2. 1 kg mageres Oshsenfleisch wird 5 Stunden in 4 Liter Wasser gekocht, bleibt dann an einem kühlen Orte stehen. Am folgenden Tage mit Natronlauge neutralisirt, 10 Minuten gekocht, filtrirt und auf 4 Liter gebracht. In Kolben von ca. 0,6 Liter Inhalt vertheilt, welche zugeschmolzen und 2 Stunden bei 110° gehalten werden; das sp. Gewicht bei 20° ist c. 1,003.
3. Der Bouillon 2 werden auf 1 Liter 10 gr Kochsalz zugefügt, wodurch das sp. Gewicht auf 1,009 steigt.

   Fol[2]) empfiehlt die Bouillon erst 1 Stunde bei 110° zu kochen, dann zur Entfernung des entstandenen Niederschlags nochmals zu filtriren und nun erst definitiv 4 bis 6 Stunden im Papin'schen Topfe zu sterilisiren. Ein Vortheil der Einwirkung der Temperatur über 100° besteht nach Fol darin, dass ein Theil des Eiweisses peptonisirt und dadurch löslich wird.
4. Von universeller Brauchbarkeit hat sich mir folgende schnell herzustellende Lösung erwiesen, welche 3% trockenes Pepton, 0,5% Trauben- oder Rohrzucker und 0,1% Fleischextract enthält. Statt Pepton und Fleischextract gesondert, kann man auch 2 bis 3% Fleischpepton nehmen.

---

1) Les organismes vivants de l'atmosphère 1883, S. 151.

2) Archives des sciences physiques et naturelles 1884, S. 566.

5. Am meisten scheint mir aber für diese Zwecke die Bouillon von Löffler[1]) zu leisten: $^1/_2$ kg gutes fein gehacktes Ochsenfleisch wird mit 1 Liter destillirtem Wasser versetzt, gut durchgerührt und bleibt 24 Stunden im Eisschranke stehen. Dann wird dasselbe durch Gaze, event. mit einer besonderen Fleischpresse, gepresst und die Flüssigkeit durch Zusatz von destillirtem Wasser wieder auf 1 Liter gebracht. Zu diesem trüben Fleischwasser fügt man 10 gr trockenes Pepton und 5 gr Kochsalz und kocht auf, neutralisirt die heisse Lösung mit Natriumcarbonat- oder Natriumphosphatlösung und kocht dann 1 bis 2 Stunden im Papin'schen Topfe oder Dampfsterilisirungs-Cylinder. Nach dem Erkalten filtrirt man durch eine doppelte Lage von Filtrirpapier und sterilisirt die durch destillirtes Wasser auf 1 Liter gebrachte Flüssigkeit durch strömende Dämpfe in zwei Stunden, was ev. später noch einmal zu wiederholen ist, oder noch besser und schneller eine halbe Stunde in gespannten Dämpfen von 120°. Sollte noch ein feiner Niederschlag entstehen, so kann man am folgenden oder zweiten Tage noch einmal filtriren und durch Dampf sterilisiren.

Für Hefen und Pilze muss man die Bouillon sauer lassen, im Uebrigen aber ebenso behandeln wie die neutrale und alkalische. Am meisten empfiehlt sich aber für diese Zwecke die schwach sauere Bierwürze, welche ohne neutralisirt zu werden, aufgekocht, filtrirt und dann durch Dampf sterilisirt wird. Weniger allgemein brauchbar, aber für Hefen oft recht zu empfehlen, ist auch der pasteurisirte d. h. durch relativ niedrige Temperaturen sterilisirte schwach sauere Trauben-Most, den man in manchen Weingegenden im Grossen herstellt.

Von grosser Wichtigkeit ist noch die Milch. Dieselbe muss in Gläsern von böhmischem Glase oder in gründlich gewässertem weichem Glase aufgenommen werden. Zum sicheren Sterilisiren muss man gespannten Dampf von 120° 10 bis 15 Minuten einwirken

---

[1]) Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte, 1881, Bd. I, S. 169.

lassen. Bei strömendem Dampfe ist selbst bei Reagirgläsern mindestens eine Stnnde erforderlich und, um ganz sicher zu gehen, wird meistens ein discontinuirliches Kochen erforderlich derart, dass man die Milch am ersten Tage eine Stunde und am 2. und 3. Tage je 20 bis 30 Minuten den strömenden Dämpfen von 100° aussetzt.

Petruschky[1]) empfiehlt auch die Molke, welche derart gewonnen wird, dass frische Milch nach gelinder Erwärmung mit stark verdünnter Salzsäure versetzt wird. Das abgeschiedene Caseïn wird abfiltrirt, das Filtrat genau neutralisirt, dann 1 bis 2 Stunden gekocht und nochmals filtrirt.

Herstellung der Nährgelatine. Man setzt nach Koch[2]) zu einer der bewährten Nährlösungen, Decocte oder Infuse reinste, kleingeschnittene Gelatine, und zwar für die meisten Fälle circa 10% Gelatine. Diese Gelatine lässt man eine halbe bis einige Stunden quellen, löst sie dann unter mässigem Erwärmen vollständig auf. Da die Gelatine sauer reagirt, die meisten Bakterien aber neutrale oder schwach alkalische Reaction erfordern, wird die warme Gelatinelösung mit Natriumcarbonat neutralisirt, oder für viele Fälle noch besser überneutralisirt bis zur ganz schwachen Bläuung von rothem Lackmuspapier.

Die neutralisirte Gelatinelösung wird dann zur völligen Ausscheidung der Neutralisationspräcipitate und aller durch Hitze coagulirbaren Substanzen ungefähr eine Stunde auf dem Wasserbade gekocht und darauf heiss durch ein angefeuchtetes Faltenfilter filtrirt. Das Filtrat muss nach erneutem Aufkochen in der Kälte klar ohne jede Trübung erstarren; eine vorübergehende Trübung beim Aufkochen durch Phosphate, welche in der Kälte wieder schwindet, hat nichts zu sagen.

Es giebt selbstverständlich keine Nährgelatine, welche allen Bakterien gleich gute Existenzbedingungen bietet. Aber es bleibt wünschenswerth gelatinirte Lösungen zu besitzen, welche möglichst universell verwerthbar sind, so dass sie möglichst vielen Bakterien-

---

[1]) Centralblatt f. Bakterielogie 1889, VI, No. 24.

[2]) Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte 1881, Bd. I, S. 23.

arten wenigstens *so günstige Bedingungen bieten, dass sich die Keime bis zu erkennbaren und trennbaren Kolonien entwickeln können.* Dies leisten die S. 243 angegebenen Lösungen, vor Allen die von *Löffler* angegebene Fleischbrühe. Man fügt zu einem Liter ausgepressten Fleischsaft 10 gr trocknes Pepton, 5 gr Kochsalz und 100 gr reinste Gelatine, löst die Gelatine, durch Erwärmen im Wasserbade, neutralisirt die warme Lösung mit kohlensauerem oder phosphorsaurem Natron, kocht 1 bis 2 Stunden lang auf dem Wasserbade und *filtrirt heiss.*

Man bedient sich zum Filtriren eines Heisswassertrichters, Fig. 24 (T), bei dem die zwischen dem Glastrichter und dem äusseren Kupfermantel befindliche Wasserschicht durch eine Flamme warm gehalten wird, welche unter dem seitlichen, mit dem Wassermantel in Verbindung stehenden Ansatze a angebracht wird. Gewöhnlich filtrirt man durch ein glattes oder Faltenfilter aus Filtrirpapier. Weniger bequem gelingt es ohne diesen Heisswassertrichter, wenn man successive kleine, heisse Portionen filtrirt, wobei man vortheilhaft durch eine kleine Flamme den gewöhnlichen Glastrichter von Zeit zu Zeit vorsichtig anwärmt. *Jacobi*[1]) hat zur Beschleunigung des Filtrirens vorgeschlagen, eine grosse Titrirröhre von 1,5 Liter Rauminhalt, von ca. 70 cm Länge und 6 cm Durchmesser über der unteren Ausflussöffnung mit einer 5 cm hohen Schicht von entölter Watte fest zu verstopfen. In diese Röhre wird die verflüssigte heisse Gelatine auf das Wattefilter aufgegossen. Darauf wird die Röhre am anderen Ende mit einem fest schliessenden und gut zu befestigenden Gummipfropf verschlossen, welcher in einer Durchbohrung ein Glasrohr trägt. Dieses Glasrohr wird dann mit einem Gebläse verbunden und nun durch Compression der Luft in der Röhre über der

Fig. 24.



[1]) Centralblatt für Bakteriologie 1888, Bd. III, No. 17.

Gelatinelösung die sonst sehr schwer durch die dicke Watteschicht filtrirende Flüssigkeit hindurchgepresst.

Zum schnellen Klären der Gelatine schlägt Jacobi vor, die neutralisirte, warme Gelatinelösung mit dem Weissen eines Eies durchzuschütteln und dann eine halbe Stunde den strömenden Dämpfen auszusetzen. Das sich abscheidende Eiweiss reisst dabei die trübenden Substanzen nieder.

Von Zusätzen, welche die Löffler'sche Fleischwasser-Pepton-Kochsalz-Gelatine bisweilen erhält, sind noch besonders zu nennen Traubenzucker zu 0,5 bis 3 % und Glycerin in der Menge von 3 bis 10 %.

Die neutrale, klare Nährgelatine wird dann mit Hülfe eines sterilisirten Trichters oder einer Pipette in sterilisirte Reagirgläser gefüllt zu ungefähr einem Drittel des Inhalts der Gläser, etwa 7 ccm entsprechend, und der sterilisirte Wattepfropf darauf wieder aufgesetzt. Zum gleichmässigen Einfüllen bestimmter Mengen Gelatine oder Bouillon kann man den Apparat von Treskow[1]) verwenden.

Diese in Reagirgläsern befindliche Nährgelatine wird sterilisirt durch discontinuirliches Kochen. Man kann zu diesem Zwecke die in den Reagirgläsern erstarrte Gelatine direct in der Flamme vorsichtig lösen und dann in der Flamme aufkochen oder dieselbe durch Einsetzen der Reagirgläser in warmes Wasser erst lösen, dann nach Abtrocknen der Gläser in der Flamme kurz aufkochen oder auch einige Tage hintereinander je 10 Minuten im Wasserbade oder selbst im Dampfstrome kochen. Dieses Aufkochen wiederholt man an 4 bis 5 Tagen je einmal. Hat die Gelatine längere Zeit gestanden, so dass sie anfängt durch Verdunsten abzunehmen, so muss sie vor dem Gebrauche noch einmal verflüssigt und aufgekocht werden. Die Ansicht von Fol, dass man in zwei Stunden im Papin'schen Topfe das Sterilisiren sicher erreichen kann, muss zugegeben werden, doch leidet dadurch die Fähigkeit des Gelatinirens etwas. Will man die 10 % Gelatine im gespannten Dampfe sterilisiren, so verfährt man nach Heydenreich besser so, dass man den Apparat zuerst für sich auf 100° bringt und dann

---

[1]) Repertorium der analytischen Chemie 1887, S 505.

erst die (am besten sogar vorher bereits verflüssigte) Gelatine mit dem Blechcylinder einsetzt. Die Zeit des Anwärmens von 100° auf 120° wird dadurch so stark abgekürzt, dass man bei geringen Mengen Gelatine in jedem Kölbchen oder Reagirglase dieselben 10 bis 15 Minuten der Temperatur von 120° ansetzen kann ohne die Gelatinirbarkeit aufzuheben oder wesentlich zu vermindern.

Für solche Fermentorganismen, welche einen saueren Nährboden erfordern, wie Hefen und Pilze, ist die Würzgelatine als die universellste zu bezeichnen. Bierwürze wird mit 10% Gelatine versetzt, die letztere durch Erwärmen verflüssigt und das ganze einige Zeit gekocht Darauf wird ohne zu neutralsiren filtrirt. Die Acidität, welche auf diese Weise resultirt, ist etwas grösser als die der Würze vor dem Gelatine-Zusatz; doch habe ich niemals davon eine Unzuträglichkeit bemerkt. Wünscht man genau denselben Säuregehalt zu erhalten, dann muss man den Säure-Ueberschuss der Gelatine durch Natriumphosphat neutralisiren und mit sehr empfindlichem Reagenzpapier oder ganz genau titrimetrisch einstellen.

Milch hatte sich mir bereits früher in Form einer Milchserumgelatine bewährt, doch waren die Vortheile nicht gross genug, um diese relativ schwierige Herstellung allgemeiner empfehlen zu können, da alle von mir damals untersuchten Organismen auf der viel bequemer herzustellenden gewöhnlichen neutralen Fleischwasser-Peptongelatine eben so gut wuchsen. Neuerdings hat van Puteren[1]) wieder die von mir schon 1883 verwendete Art empfohlen, indem er das Kaseïn mit Lab fällt und die Molke mit 10% Gelatine und dem Eiweiss von 2 Hühnereiern auf 1 Liter Milch versetzt, nach dem Lösen und Aufkochen filtrirt. Von Frl. Raskin[2]) wurde Milch in drei verschiedenen Formen zur Gelatine verwendet. Auch in diesem Falle scheinen diese Medien keine deutliche Ueberlegenheit über die gewöhnliche Gelatine bewährt zu haben. 1) Milchserum-Gelatine mit Ersatz des auszuscheidenden

---

1) Referat von Ettlinger im Centralblatt f. Bakteriologie 1889 V, No. 5.

2) Wratsch 1887, No. 40. Referat von Heydenreich in: Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie 1887, Bd. IV, S. 502.

Kaseïns durch Pepton wird in folgender Weise gewonnen: 1 Liter unabgerahmte Milch wird auf 60 bis 70° erwärmt und dann 70 bis 100 gr Gelatine hinzugefügt. Nach Auflösen der letzteren wird einige Minuten gekocht, wobei das Kaseïn ausfällt, welches durch Coliren entfernt wird. Die trübe Flüssigkeit wird etwa 20 Minuten bei Brüttemperatur gehalten, um das Fett an der Oberfläche sich sammeln zu lassen. Dann lässt man erkalten und entfernt die Rahmschicht. Die nunmehr fast klare Flüssigkeit wird aufgekocht, mit 1 % Pepton versetzt, neutralisirt und dann filtrirt. Das Sterilisiren erfolgt in der früher geschilderten Weise.

2) Milchserum-Gelatine mit Ersatz des Kaseïn durch Natronalbuminat. Das letztere wird nach Lieberkühn in modificirter Weise gewonnen, indem Hühnereiweiss unter Umrühren tropfenweise so lange mit concentrirter Natronlösung versetzt wird, bis sich dasselbe in eine halbfeste, durchsichtige Masse verwandelt hat. Diese Masse wird mit sterilisirtem Messer geschnitten, mit destillirtem, sterilisirtem Wasser ausgewaschen und dann lässt man stehen, bis sich die Masse in eine dicke, gelbliche Flüssigkeit verwandelt. Diese stark alkalische, von Raskin der Kaseïnlösung gleich geschätzte Flüssigkeit wird bis zu 3 % der ad 1) genannten Milchserum-Gelatine an Stelle des Pepton zugesetzt. Ein besonderes Neutralisiren ist meist unnöthig. 3) Milchkaseïn-Gelatine. Die Milchserum-Gelatine wird mit 2,5 % Kaseïn versetzt. Raskin stellte sich das Kaseïn in folgender Art dar. Milch wird zwei Tage sich selbst überlassen, dann abgerahmt und das Coagulum 20 Minuten bei 70° erwärmt zum besseren Auspressen des Serum. Die gut ausgepressten Kaseïn-Coagula werden dann in 95 % Alkohol ausgewaschen, getrocknet, gepulvert, im Kolben mit Aether entfettet. Dann wird das Kaseïn zwischen Filtrirpapier getrocknet und bei 120 bis 140° 10 bis 15 Minuten erhitzt. Dadurch verwandelt sich das Kaseïn in klebrige, fadenziehende Stücke, welche nach Auswaschen mit Natronlauge hornartig, durchsichtig und nach dem folgenden Trocknen steinhart werden.

In allen diesen Fällen kann man statt der gewöhnlichen Gelatine nach Klebs auch Hausenblase nehmen.

Die Vorzüge der gelatinirten Lösungen gegenüber einfachen Lösungen bestehen darin, dass man dieselben über 30° als Flüssigkeit und unter 25° als feste Substrate verwenden kann. Sollen aber gelatinirte Lösungen über 25° fest bleiben, so geht dies nach Pekelharing z. B. dadurch, dass man das discontinuirliche Sterilisiren statt bei 100° bei nur 80° vornimmt; aber auch diese Nährgelatinen bleiben nur bis zu 30° fest und wir müssen oft bis zur Bluttemperatur und höher gehen können, ohne Verflüssigung zu erhalten.

Dies wird erreicht, wenn man statt thierischer, gelatinirender Substanzen Pflanzen-Gallerten verwendet, von denen von Frau Hesse zuerst Agar-Agar in die Bakteriologie erfolgreich eingeführt wurde. Es ist hierbei zu berücksichtigen, dass die Gelatine ein Derivat der Albuminate ist und dadurch auch eine bestimmte Stelle als Nährmedium einnimmt, welche unabhängig von seiner physikalischen Eigenschaft des Gelatinirens mit zur Wirkung kommt. Agar-Agar, Gelose der Franzosen, dagegen hat Beziehungen zur Gruppe der Kohlehydrate, speciell zum Pflanzengummi. Da manche Bakterien und Hefen die Fähigkeit haben, diese Körper der Pflanzen-Gallerten in gährfähigen Zucker überzuführen und diesen zu vergähren, so entstehen oft in erstarrten Agar-Agarlösungen Gase, welche die Masse zerreissen, während dieselben Bakterien in Gelatine keine Gasentwicklung bewirken. Bei Gelatine wiederum ist zu beachten, dass dieselbe zu den autoxydablen Körpern gehört. Spina[1]) zeigte, dass mit Methylenblau oder indigschwefelsauerem Natron gefärbte Gelatine von selbst in einiger Zeit ganz entfärbt wird; dasselbe ist uns auch mit Lackmus passirt. Die Gelatine als solche verbraucht Sauerstoff, besonders bei gleichzeitiger Anwesenheit von Licht, den sie den Farben entzieht, wodurch dieselben in farblose Reductionsprodukte oder Leukoprodukte wie Indigweiss oder Leuko-Methylenblau reducirt werden. In Folge dieser allerdings geringen Autoxydation der Gelatine durch Reduction von Körpern, welche in derselben gelöst waren, ist die Gelatine im Inneren von dickeren Schichten als sauerstofffrei zu betrachten und die Färbung der ober-

---

[1]) Centralblatt für Bakteriologie 1887, Bd. II, No. 2.

flächlichen Schichten zeigt deutlich, bis wohin der Luftsauerstoff eindringt. Gelatine ist dadurch für gewisse Versuche mit Luftabschluss sehr geeignet und Agar-Agar eignet sich für andere derartige Versuche dadurch, dass es ev. in einen gährfähigen Körper übergeführt werden kann, welcher bei Luftabschluss leicht gespalten wird.

Unter dem Namen Agar-Agar werden ganz verschiedene asiatische Pflanzen-Gallerten zusammengefasst. Die Form ist ebenfalls sehr verschieden. Die bei uns gebräuchlichen Sorten werden in Streifen oder pulverisirt verkauft. Bekanntere Handelssorten sind Agar-Agar von Ceylon (Ceylon-Moos) von Gracilaria lichenoides, Agar-Agar von Makassar und Java von Eucheuma (Gigartina) speciosa. Von Disse und Taguchi werden auch die Agar-Agarsorten von Japan (Kanten) eingeführt, welche besonders von Gelidium corneum, aber auch von G. cartilagineum und Gloeopeltis tenax gewonnen werden. Das sogenannte japanische Moos von Gloeopeltis califormis bildet jedoch keine Gallerte, sondern nur einen dicken Schleim.

Statt 10 % Gelatine fügt man den Lösungen 1 bis höchstens 2 % kleingeschnittenes Agar-Agar bei und löst dasselbe durch längeres Kochen auf dem Wasserbade oder im Dampfstrome möglichst vollständig auf. Die heisse schwachsauere Lösung wird mit Natrium-Phosphat oder Carbonat neutralisirt und dann zwei Stunden auf dem Wasserbade oder noch besser im Dampfstrome gekocht zur Ausscheidung der durch Hitze gerinnbaren Substanzen und der Neutralisationspräcipitate. Die Filtration der heissen Agarlösungen geschieht, indem man das Aufnahmegefäss mit dem mit doppelter Lage Filtrirpapier versehenen Trichter in den im Kochen gehaltenen Dampfsterilisirungs-Cylinder setzt. Nach Rosenbach[1]) füllt man den Trichter mit Watte und lässt die Agarschicht die dicke Watteschicht passiren, während der heisse Dampf den Apparat durchströmt. Ich ziehe es vor den Trichter erst mit einem glatten Filter aus doppelter Lage Filtrirpapier auszukleiden und dann den Innenraum etwa zur Hälfte dicht mit Watte oder Glaswolle auszufüllen; das Filtrat ist

---

[1]) Mikro-Organismen bei den Wund-Infections-Krankheiten des Menschen 1884, S. 16.

dann ganz klar. Man kann die heisse Agarlösung auch nach Jacobi l. c. durch Druck etwas schneller filtriren. A. Fraenkel[1]), Guillebeau und von Freudenreich[2]) lassen die heisse Agarlösung durch längeres Verweilen bei einer Temperatur über 42° im Dampfapparate sich durch Sedimentirung klären und giessen oder pipettiren dann einfach nur die geklärten Mengen ab; auf diese Weise umgeht man das oft unbequeme Filtriren ganz.

Das Einfüllen der klaren Agar-Agarlösung in die Reagirgläser geschieht wie bei der Gelatine, das Sterilisiren erfolgt 2 bis 3 Stunden durch strömende oder eine halbe Stunde durch gespannte Dämpfe in einer Sitznng, da die Fähigkeit des Erstarrens der Agarlösungen durch längeres Einwirken einer Temperatur von 100° bis 120° nicht beeinträchtigt wird.

H. Buchner bewirkt die Lösung des Agar-Agar zusammen mit der Präparation der Fleischbrühe, setzt die gewünschte Menge Pepton, Kochsalz ebenfalls sofort hinzu und kocht alles zusammen im Digestor. Nach Abkühlen auf 100° wird die heisse Lösung neutralisirt, noch einmal aufgekocht, filtrirt, in trockene Gläser abgefüllt, welche mit nicht sterilisirter Watte verschlossen sind, und sofort bei 120° endgültig sterilisirt. Auf diese Weise hat man in einigen Stunden die Agar-Agarlösung gebrauchsfertig. Ebenso verfahren v. Freudenreich und Bujwid[3])

Die 1 bis 2% Agarlösungen verflüssigen sich bei Temperaturen, welche wenig über der Bluttemperatur liegen, sehr langsam. Man kocht desshalb das fest gewordene Agar-Agar zum Verflüssigen auf und lässt es bis auf die gewünschte Temperatur abkühlen; das Festwerden beginnt dann bei ca. 40°.

Durch Combination von Gelatine mit Agar kann man Lösungen erhalten, welche zwischen 25° und 40°, den Erstarrungstemperaturen der 10% Gelatine und des 2% Agar-Agar, liegen. Agar hat die unangenehme Eigenschaft, dass es beim Erstarren Wasser auspresst. Dieses austretende Wasser hindert oft ein festes Haften des Agar

---

[1]) Zeitschrift für klin. Medicin, 1886. Bd. 10.

[2]) Archives des Sciences physiques et naturelles de Genève; 1886. S. 466; Centralblatt für Bakteriologie 1888, III, No. 25.

[3]) Centralblatt für Bakteriologie 1888, III, No. 3.

an der Glaswand und stört auch das Aussehen der Kulturen leicht. Man kann dem entgehen, wenn man dem Agar 1 bis 2 % Gelatine oder nach Esmarch[1]) ebensoviel Gummi arabicum zusetzt.

Zusätze von Zucker zur Agarlösung werden seltener erforderlich, dagegen haben Nocard und Roux[2]) gezeigt, dass ein Zusatz von 5 bis 10 % Glycerin für manche Kulturen ausgezeichnet ist. Für andere Arten, besonders für Pigmentbakterien ist jedoch im Allgemeinen das gewöhnliche Agar vorzuziehen. Man bedarf demnach ausser dem gewöhnlichen Fleischwasser-Pepton-Agar auch noch des Fleischwasser-Pepton-Glycerin-Agar oder kürzer des Glycerin-Agar.

Milchserum-Agar und Würz-Agar werden genau wie die entsprechenden Gelatinen hergestellt, nur wird statt 10 % Gelatine 1 bis 2 % Agar-Agar genommen; bei dem Würz-Agar fällt ausserdem das Neutralisiren fort.

Mit Rücksicht auf die Beobachtungen von Globig, dass einzelne Bakterien nicht unter 50° zu wachsen scheinen, ist es wünschenswerth, gelatinirende Lösungen zu besitzen, welche auch bei relativ hoher Temperatur fest bleiben. Dies leistet 2 % Agar nicht mehr sicher, wohl aber scheint es unter Umständen mit Pflanzengallerten aus europäischem See-Tang erreichbar. Dieselben wurden zuerst von Miquel[3]) eingeführt und zwar nahm er das irische Moos oder Carragheen, Knorpeltang von Chondrus crispus und Gigartinea mamillosa. Für die gewöhnlichen Fälle nimmt man statt 1 bis 2 % Agar-gar, 2,5 bis 3 % Fucusmasse; dieselbe muss vor dem Neutralisiren durch ein Tuch gepresst werden, weil sie sich nicht vollständig löst.

Miquel bereitete daraus eine Nährgallerte, der er nachrühmt, dass sie erst zwischen 55 und 60° schmilzt. Er setzt entweder die Masse direct zur Bouillon oder er bereitet sich in der Regel aus dem Carragheen erst eine Gelatine in folgender Weise; 300 bis 400 gr werden in 10 Liter Wasser mehrere Stunden bei 100° gekocht, dann durch ein Haarsieb gegossen. Das Filtrat wird von

---

[1]) Zeitschrift für Hygenie 1886, 1. S. 301.

[2]) Annales de l'Institut Pasteur 1887, I. S. 19.

[3]) Annuaire de l'observatoire de Montsouris pour l'an 1885, S. 569.

Neuem aufgekocht und heiss durch ein feines Colirtuch filtrirt. Das Filtrat wird auf dem Wasserbade langsam eingedampft, dann in Porzellanschüsseln gebracht und auf einem feinen Netze bei 40 bis 45° getrocknet. Ein Prozent dieser fertigen Gelatine soll bereits der Bouillon die Fähigkeit verleihen, bei 45° bis zu 50° fest zu bleiben.

Edington[1]) weicht 2 Theile feinstes irisches Moos mit 18 Theilen Wasser über Nacht auf, dann wird es unter öfterem Umrühren 1½ Stunden im Dampfstrome gekocht. Hierauf wird die Masse durch Flanell oder Filz zwei bis dreimal gepresst. Diese klare Masse erstarrt bei 31° C. Wird die Masse aber auf 10 Theile (etwa die Hälfte) eingedampft, so tritt die Verflüssigung des festgewordenen Mediums erst bei 50 bis 55° C. ein. Edington setzt der schwächeren oder stärkeren Lösung, auf deren Nährkraft er mit rechnet, eventuell noch 2% Pepton und 1% Zucker zu.

Man kann die verflüssigte Gelatine und das Agar in den Reagirgläsern auch in schräger Lage, Fig. 23 und 25, erstarren lassen; in den Agarröhrchen sammelt sich unten nach dem Aufrichten der Röhrchen etwas Condensationswasser.

Anhangsweise sei hier noch erwähnt, wie man sich Agar-Agar als Einbettungsmasse für Schnitte herstellt. Biondi[2]) fügt zu 100 ccm klarer, schwach alkalischer 2% Agar-Agarlösung (in destillirtem Wasser, ohne Zusätze) das Weisse eines Eies, schüttelt innerhalb 10 Minuten mehrmals gut durch, kocht eine Stunde im Dampfstrome, filtrirt und neutralisirt genau. Pro Einbettung sind ca. 5 ccm erforderlich; die Härtung nach der Einbettung in der verflüssigten und möglichst tief abgekühlten Agarlösung erfolgt in 85% Alkohol. Soll in absolutem Alkohol gehärtet werden, so fügt man dem Agar am besten 3% Gelatine bei.

Die bis jetzt betrachteten Lösungen und die gelatinirten Nährmedien dienen theils im Zustande der Lösungen, theils im erstarrten Zustande als Nährsubstrate für Mikroorganismen, aber sie werden auch zur Trennung und Reinkultivirung der verschiedenen Arten verwendet. Soweit sie wesentlich als Nährsubstrate dienen, sollen

---

[1]) The Lancet 1886, S. 704.

[2]) Archiv f. mikrosk. Anatomie 1887. Bd. 31, S. 103.

die in und auf ihnen sich zeigenden Wachsthumseigenthümlichkeiten dazu dienen, die Artbestimmung zu ermöglichen. In der Regel geschieht das Wachsthum ohne auffallende Farbbildungen. Setzt man aber an sich ungefärbte Körper zu, welche durch Oxydation oder Reduction, durch Säure- oder Alkalibildung in gefärbte Verbindungen übergeführt werden, so müssen manche Eigenschaften sich deutlicher bemerkbar machen. Dasselbe muss der Fall sein, wenn man gefärbte Körper hinzufügt, welche entweder eine Aenderung der Farbe erfahren oder farblos werden können. Wir erhalten so verschiedene Gruppen von Zusätzen, welche uns wirkliche Ergänzungen liefern.

I. A. Poehl[3]) fügte 0,05 % Ferrichlorid und rothes Blutlaugensalz hinzu und erwartete durch Reduction die Bildung von Berliner Blau. Ferrocyankalium (gelbes Blutlaugensalz) liefert mit Ferrisalzen Berliner Blau; Ferricyankalium (rothes Blutlaugensalz) liefert mit Ferrosalzen Turnbull's Blau. Aber Ferrocyankalium liefert mit Ferrosalzen und Ferricyankalium mit Ferrisalzen keinen derartig gefärbten blauen Körper. Giebt man also Ferricyankalium plus Ferrisalz zu einer Lösung, so entsteht keine characteristische Farbe, wird aber das Ferricyankalium zu Ferrocyankalium reducirt, so bildet sich in Folge der Anwesenheit des Ferrisalzes sofort Berliner Blau. Dies geschieht aber nur in sauerer Lösung. Man muss also entweder schwach sauere Lösungen verwenden oder, da die meisten Bakterien neutrale oder schwache alkalische Lösungen zum Wachsthum erfordern, nach erfolgtem Wachsthum mit Salzsäure ansäuern. Dass dieser Gedankengang von Poehl berechtigt ist, habe ich bei Verwendung von derartig behandelter Bouillon gesehen. Soweit Poehl mit Gelatine gearbeitet hat, sind seine Angaben jedoch nicht ganz einwandsfrei, weil die Gelatine als autoxydabler Körper selbst schon diese Reduction ausführt. Da dies aber immerhin einige Zeit dauert, kann man den Versuch doch auch mit Gelatine machen, unter Beachtung eines von Spina l. c. richtig gewürdigten Umstandes,

---

[3]) Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 1886. Bd. 19, S. 1159.

dass nämlich bei frischer Herstellung derartiger Gelatinen diese Reduction durch die Gelatine einige Zeit in Anspruch nimmt, während dieselbe Reduction durch Bakterienwachsthum schneller eintritt.

Aehnlich könnte man auch versuchen durch Zusatz von Ferrocyankalium plus Ferrochlorid auf eintretende Oxydation zu prüfen. Da diese Oxydation bei Luftzutritt aber spontan sehr schnell erfolgt, ist dieser Versuch nur bei Luftabschluss brauchbar, um zu erkennen, ob trotz des Luftabschlusses eine wirkliche intermediäre Sauerstoffübertragung erfolgt.

Für diese und die folgenden beiden Gruppen ist zu bemerken, dass man sich die als Reagentien dienenden einzelnen Salze resp. Farben am besten in genau bekannten oder eventuell in concentrirten wässrigen Lösungen herstellt, dieselben für sich sterilisirt und erst nach dem Erkalten den für sich sterilisirten Lösungen, Bouillon, Gelatine, Agar zusetzt. Die Gelatine wird zu diesem Zwecke verflüssigt und bei 30°, Agar-Agar wird verflüssigt und bei ca. 40° mit der ebenso warmen Farblösung versetzt. Die Farblösungen sollen nur so stark gewählt werden, dass sie gerade als Reagentien gut erkennbar sind. Ein Mehr ist überflüssig und bei nicht ganz reinem oder giftigem Material sogar schädlich. Von Ferricyankalium und Ferrichlorid wird so viel zugesetzt, dass der Gehalt der ganzen fertigen Lösung etwa 0,01 bis 0,05% beträgt.

II. Für Oxydationsversuche empfiehlt sich nach Pfeffer[1] bisweilen eine Jodkalistärke mit 0,016% Jodkalium und 0,01% Eisenlactat.

III. Lösungen von Lackmus wurden zuerst von Helmholtz[2] angewendet und von Naegeli[3] wieder von Neuem eingeführt und später von H. Buchner[4], dann von Marpmann[5] ver-

---

[1]) Abhandlungen der mathematisch-physikalischen Classe der Kgl. Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften, 1889, XV No. V.

[2]) Müller's Archiv für Anatomie und Physiologie 1843, S. 453.

[3]) Theorie der Gährung 1879, S. 40.

[4]) Archiv für Hygiene 1885, III., S. 418.

[5]) Centralblatt für allgemeine Gesundheitspflege. Ergänzungshefte 1886, II., S. 117.

wendet. Der Uebergang in alkalische oder sauere Reaction ist für manche Gährungserreger durch die Veränderung der Farbe des Lackmus sehr scharf zu verfolgen. Daneben ist aber Lackmus noch wichtig, weil es durch Reduction entfärbt wird, eine Eigenschaft, auf welche Cahen[1]) und R. Dubois[2]) von Neuem besonderen Werth gelegt haben, weil Lackmus für die Bakterienvegetationen fast ganz indifferent zu sein scheint und dadurch gegenüber den anderen derartig wirkenden Körpern der folgenden Gruppen manche Vorzüge besitzt. Die anderen Indicatoren der Chemie könnten eventuell auch Verwendung finden, um über Säure und Alkalibildung schneller Aufschluss zu bekommen.

IV. Die Reduction von Indigblau in Indigweiss wurde von M. Traube[3]) bei seinen Gährversuchen eingeführt und später wieder von Spina[4]) durch Verwendung von indigschwefelsaurem Natron verwerthet. In diesen Fällen bleiben die oberflächlichen Schichten, soweit der Luft-Sauerstoff diffundirt, gefärbt und die tieferen Schichten werden in Folge der Reduction farblos. Durch Schütteln kann man bei Flüssigkeiten eine Reoxydation und damit wieder eine Färbung herbeiführen, welche in der Ruhe wieder verschwindet, so lange noch Vermehrung der Bakterien und damit Reduction möglich ist. Am Licht kann übrigens nach Pfeffer, besonders bei Gegenwart von Eisensalzen, das Indigblau auch durch Oxydation zu Isatin farblos werden, welches aber durch Reduction nicht wieder in Indigblau verwandelt wird.

V. Die Reduction von Anilinfarben zu Leukoprodukten wurde von Spina l. c. mit Methylenblau eingeführt. Rozsahegyi[5]) versuchte in ähnlicher Weise noch andere basische Anilinfarben. Es wurde anfangs nicht genügend beachtet, dass vielen Anilinfarben von der Herstellung Beimischungen anhaften können,

---

1) Zeitschrift für Hygiene 1887. Bd. II., S. 386.

2) Bulletin de la siciété chimique de Paris 1887, Bd. 49. S. 963.

3) Theorie der Fermentwirkungen 1858.

4) Centralblatt für Bakteriologie 1887. Bd. II., No. 2.

5) Centralblatt für Bakteriologie 1887. Bd. II., No. 14.

welche ev. giftig wirken und dadurch das Wachsthum beeinträchtigen, und dass viele Anilinfarben an sich schon in geringen Mengen giftig wirken, besonders die violetten Farben, welche später von Stilling[1]) als „Pyoktanin" in die Therapie eingeführt wurden. Durch Cahen und Rozsahegyi wurde gefunden, dass alle die Gelatine verflüssigenden Arten die Farben reducirten, doch wurde nicht berücksichtigt, ob sich während der Verflüssigung an der Oberfläche eine Membran bildete, welche den Luftsauerstoff vom Inneren der verflüssigten Gelatine abhielt.

Von den Anilinfarben eignen sich nach Pfeffer l. c. besonders Cyanin und Methylenblau zum Nachweise von Oxydationen, besonders bei gleichzeitiger Anwesenheit von ca. 0,02 % Eisenvitriol oder Eisenlactat.

Die Bildung von ungefärbten Producten kann also auf dem Wege der Reduction, zum Theil aber auch, besonders bei Lichtzutritt durch Oxydation erfolgen, so dass man die Bedingungen und chemischen Möglichkeiten sorgfältig abwägen muss.

Lackmus, Indigo und z. Th. die Eisensalze dringen nicht in die Zellen ein, sondern werden extracellulär beeinflusst, so dass die Reduction zu Leukoprodukten nur durch Gährthätigkeit zu Stande kommt. Die Anilinfarben, Jodkali und z. Th. die Eisensalze reduciren ausserhalb, dringen aber auch in die lebenden Zellen ein.

Statt der einfachen Farben mit ihren wohl charakterisirten, chemisch wenigstens etwas verfolgbaren Veränderungen hat Noeggerath[2]) Farbgemische vorgeschlagen. Er nimmt von concentrirten wässrigen Lösungen der folgenden Anilinfarben:

Methylenblau 2, Gentianaviolett 4, Methylgrün 1, Chrysoidin 4, Fuchsin 5 ccm und verdünnt dieselben mit 200 ccm Wasser. Dadurch entsteht eine Flüssigkeit, welche auf Filtrirpapier dunkelgraue bis bläulichschwarze, und bei Zusatz gleicher Menge Wasser hellgraue Flecken macht. Diese Flüssigkeit wird durch Stehen während 10 bis 14 Tagen geeigneter; bei zu starkem Vortreten einer Farbe muss

---

[1]) Anilinfarbstoffe als Antiseptika I und II. 1890.

[2]) Fortschritte der Medicin 1888, Bd. VI, No. 1.

mit anderen Farben corrigirt werden, z. B. roth durch grün und violett, grün durch roth und violett, violett und blau durch Chrysoidin, so dass ein indifferentes schwarz, oder bei Verdünnung grau entsteht. Durch Bakterienwachsthum entstanden einige Mal Farben, welche in der ursprünglichen Mischung nicht vorhanden waren und dadurch vielleicht differentialdiagnostisch verwerthbar werden können.

Ausser den genannten ist in den letzten Jahren eine andere Verwendungsweise gefärbter Lösungen viel geprüft worden. Von einigen früheren Versuchen abgesehen, cfr. S. 75, hatten die Untersuchungen von Ehrlich[1]) ergeben, dass bestimmte Zellelemente intra vitam Methylenblau aufnahmen und dies führte zu weiteren Versuchen, welche ergaben, dass auch andere Zellen und einzellige Organismen Farben bereits im lebendem Zustande aufnehmen können. Cornil und Babes[2]) hatten schon 1885 in der ersten Auflage des citirten Werkes angegeben, dass, wenn man zu lebenden Bakterien spurenweise Methylviolett oder Fuchsin zusetzt, die Bakterien sich damit intensiver färben als die umgebende Flüssigkeit. Die Bakterien büssten dabei ihre Beweglichkeit mehr oder weniger ein und konnten in Folge dessen und in Folge ihrer Färbung gut beobachtet werden. Bei der Aufnahme von Phloxinroth durch die lebenden Typhusbakterien bemerkte Birch-Hirschfeld[3]) gleichfalls, dass die lebhaft beweglichen Stäbchen ungefärbt oder wenig gefärbt waren und blieben, während die anderen sich rasch und intensiv färbten. Pfeffer[4]) und G. Klebs[5]) ermittelten gleichfalls, dass einige Anilinfarben in die lebenden Zellen aufgenommen und in denselben aufgespeichert werden. Sehr gute Resultate wurden mit Methylenblau erhalten, wenn die Lösungen sehr verdünnt waren. Auch andere Anilinfarben waren brauchbar. Da nur sehr verdünnte Lösungen als nicht schädlich verwendet werden konnten, wurde eine Färbung nur durch eine Aufspeicherung der Farbe bemerkbar. Eine derartige Aufspeicherung

---

[1]) Das Sauerstoffbedürfniss des Organismus 1885.

[2]) Cornil et Babes. Les Bactéries 1886, 2. Aufl., S. 72.

[3]) Archiv für Hygiene 1887, VII, S. 341.

[4]) Botanische Zeitung 1886 und Unters. a. d. Botan. Institut Tübingen 1886, Bd. II, S. 179.

[5]) Unters. a. d. Bot. Inst. Tübingen 1886, Bd. II, S. 333.

wurde sowohl mit basischen als mit saueren Anilifarben erzielt: Methylenblau, Methylviolett, Cyanin, Vesuvin, Fuchsin, Safranin, Methylgrün, Jodgrün, aber auch Methylorange, Torpaeolin 000, Rosolsäure. Keine Aufspeicherung und Färbung wurde beobachtet bei Nigrosin, Anilinblau, Eosin, Kongoroth, und zwar bei Nigrosin und Anilinblau in Folge nachweisbarer Nichtaufnahme in die Zellen. Die Aufspeicherung erfolgte im Zellsafte bis zur Stärke 1 %iger Lösungen durch Bildung nicht oder schwer diosmirbarer Verbindungen, z. B. durch Verbindung mit Gerbsäure. Neben der Aufspeicherung im Zellsafte erfolgt bei vielen Farben auch eine Aufspeicherung im Protoplasma. In allen von Pfeffer untersuchten Fällen, besonders bei Algen und untergetauchten Wurzeln von auf Wasser schwimmenden Pflanzen, blieben im lebenden Zustande Kern und Chromatophoren ungefärbt und erst bei beginnender Schädigung des Kerns begann sich derselbe zu färben.

In gefärbten Gelatinen nahmen nach Rozsahegyi die Bakterien niemals so viel Farbe auf, um in Präparaten als gefärbt zu erscheinen. In Bouillon dagegen gelingt dies, wie Marchand gelegentlich angegeben hat und wie ich selbst beobachtet habe, ausser mit Methylviolett auch mit verschiedenen anderen basischen Anilinfarben und Birch-Hirschfeld gelang dasselbe in Bouillon selbst mit einigen saueren Anilinfarben, wie Phloxinroth und Benzopurpurin, und es trat dabei sogar eine besonders intensive Färbung gewisser körniger Massen in den Bakterien ein, deren Natur als Endosporen aber mindestens unwahrscheinlich ist.

Aus allen diesen Untersuchungen war also schon vor Stilling's Pyoktaninarbeiten bekannt, dass viele Anilinfarben, besonders die violetten, für Bakterien Gifte sind und nur in stark verdünnten Lösungen verwendet werden dürfen. Dasselbe hat Koch[1]) für die Entwickelungshemmung der Tuberkelbacillen durch Anilinfarben gefunden. Ausserdem ergiebt sich hieraus, dass die lebenden Zellen dem Färben einen gewissen Widerstand entgegen setzen, was neuerdings auch H. Buchner[2]) bestätigte. Die Farbzusätze müssen also sehr sorgfältig gewählt werden.

1) Ueber bakteriologische Forschung 1890, S. 14.

2) Centralblatt für Bakteriologie 1890, VII, No. 23.

Gewinnen von Blut und Blutserum. Am besten entnimmt man das Blut von vornherein unter aseptischen Kautelen nach einer der S. 228 angegebenen Methoden. Da dies aber nicht immer möglich ist und man in der Regel darauf angewiesen ist, das Blut grösserer Thiere bei Gelegenheit des Schlachtens zu entnehmen, verfährt man in der Regel nach Koch's ursprünglicher Vorschrift.[1])

Zum Auffangen des Blutes dienen cylindrische, ca. 20 cm hohe und 8 bis 10 cm weite, mit Glasstöpsel versehene sterilisirte Glasgefässe. Unter Oeffnen der Glasstöpsel lässt man das Blut der Schlachtthiere in dieses Gefäss hineinfliessen. Die Umgebung der Stichöffnung muss vorher gut gereinigt, zum mindesten gründlich angefeuchtet werden. Das unmittelbar nach dem Stiche abfliessende Blut, welches Schmutzpartikel der Haut und des Felles und abgeschnittene Haare mit wegspült, fängt man nicht auf. Das Gefäss wird nahe bis zum Rande gefüllt, mit Stöpsel geschlossen und baldigst in einen Eisschrank gestellt, in welchem es 24 bis 36 Stunden ruhig stehen bleibt, um die Bildung eines festen Blutkuchens zu ermöglichen. Wird das Gefäss während der Bildung des Blutkuchens bewegt, so werden dem Serum Blutkörperchen beigemengt, welche das Serum später nicht vollständig klar werden lassen.

Zur Gewinnung von menschlichem Blute verfährt man nach Bumm[2]) derart, dass man die Nabelschnur nach den ersten Inspirationen des Neugeborenen in der gewöhnlichen Weise doppelt unterbindet und durchtrennt. Der placentare Rest wird alsdann mit Sublimat und sterilisirtem Wasser gereinigt, mit den Fingern comprimirt und oberhalb der Ligatur nochmals durchschnitten. Bringt man dann das Ende der Nabelschnur in den Hals eines sterilisirten Glaskolbens und lässt mit der Compression nach, so entleert sich bei jeder Wehe und jedem Druck auf den Uterus Blut aus der Vene. Da das menschliche Blutserum nicht sehr leicht gerinnt und die Blutkuchen nicht sehr fest sind, muss das Gefäss nach dem Verschlusse besonders ruhig gehalten werden. Bei gehöriger Ruhe und

---

1) Berl. klin. Wochenschrift 1882, No. 15; Mittheilungen aus dem K. Gesundheitsamte 1881, Bd. I, S. 27; 1884, Bd. II, S. 48.

2) Deutsche med. Wochenschrift 1885, No. 33.

Zeit bildet sich über dem Blutkuchen eine reichliche Schicht von vollkommen durchsichtigem, bernsteingelb gefärbtem Serum.

War das Blut steril aufgefangen, so füllt man das an sich sterile Blutserum aus den Chamberland'schen Kolben in kleine Kolben oder Reagirgläser ab, indem man die zugeschmolzenen Kapillaren, Fig. 10 (4, b) S. 204, Fig. 19 (a) S. 231, nochmals in der Flamme erhitzt, abbricht und an den entgegengesetzten Enden, Fig. 10 (4, a), Fig. 19 (h), bläst. Bei den anderen, nicht sicher sterilen Entnahmeweisen, nimmt man das Blutserum mit sterilisirten Pipetten auf und füllt es in sterilisirte Reagirgläser über, welche zu einem Drittel gefüllt und dann sofort mit Wattepfropfen verschlossen werden. Das Blutserum in diesen Gläsern muss nunmehr der Sicherheit halber noch besonders sterilisirt werden.

Zwischen dem steril entnommenen und dem sterilisirten Blutserum und analog auch bei anderen thierischen eiweisshaltigen Producten wie Eiereiweiss[1]) ist biologisch ein grosser Unterschied.

Das Sterilisiren kann nur unterhalb der Gerinnungstemperatur des Eiweisses durch discontinuirliches Erwärmen geschehen. Man setzt zu diesem Zwecke die Reagirgläser in die mit passenden Einsätzen versehenen Apparate, Fig. 14 u. 15, S. 217, bei denen die Temperatur des Innenraums auf ca. 58° gehalten wird. Dieser Temperatur wird das Blutserum 5 bis 6 Tage lang täglich 1 bis 2 Stunden ausgesetzt. Etwas unbequemer kann man dies auch im Wasserbade erreichen. Auf dem flüssigen, sterilisirten Blutserum bildet sich oft ein Häutchen von Cholestearin, welches nicht mit den Bakterienhäutchen zu verwechseln ist.

Miquel und van Tieghem haben Bakterien beobachtet, welche im vegetativen Zustande erst zwischen 72 und 74° starben, und Duclaux giebt von einer Art sogar an, dass sie in alkalischen Flüssigkeiten im vegetativen Zustande sogar 100° ertragen könne. Hieraus leitet Miquel die Berechtigung her, die Methode prinzipiell zu verwerfen. Da aber zu einer Methode die Berücksichtigung aller Momente gehört und man sich durch richtige Entnahme des Blutes schon fast vollständig gegen diese Möglichkeiten schützen kann, so

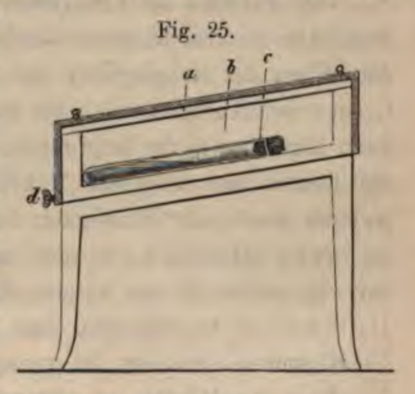
---

[1]) cfr. hierüber auch Würtz: La semaine médicale 1890, No. 3, S. 21.

ist durch tausende von Einzelversuche nachgerade sichergestellt, dass Sterilisirung von Blutserum auf diesem Wege möglich ist. Da manche Bakterien nach Globig erst über 50° wachsen, so resulirt immerhin aus diesen Einwendungen die Mahnung, den Schwerpunkt auf die Entnahme des Blutes zu legen. Die ungenügende Berücksichtigung des Momentes hat z. B. ganz allein Scheuerlen zu der Meinung geführt, dass er aus Krebssaft die Parasiten des Karcinoms gezüchet habe, während er zweifellos mit ungenügend sterilisirtem Blutserum gearbeitet hatte, in dem eine derartige widerstandsfähige Art von Kartoffelbacillen nachträglich noch zur Entwicklung kam. So habe ich z. B. einmal einige Zeit gerade in ungenügend sterilisirtem Blute aus einem Schlachthause auffallend häufig den Scheuerlen'schen Kartoffelbacillus gefunden.

Dieses steril gewonnene oder das besonders sterilisirte flüssige Blutserum, welches als solches öfters verwendet wird, wird zu anderen Versuchen oft zum Erstarren gebracht und zwar zur Erzielung einer möglichst grossen Oberfläche in stark geneigter Lage der Reagirgläser. Das sterile Serum nimmt wegen der hohen Erstarrung-Temperatur biologisch den Charakter von sterilisirtem Serum an. Zum Erstarren benutzt man einen mit Glasdeckel versehenen Blechkasten mit doppelter Wandung, welche zur Aufnahme von Wasser dient. Die vordere Seite dieses Kastens kann durch Stellschrauben, d in Fig. 25, tiefer gestellt werden als die Rückseite. Man stellt den Kasten so schräg, dass das Blutserum bis zum oberen Drittel der Reagirgläser c reicht, aber ohne den Wattepfropf zu berühren.

Fig. 25.



Die Regulirung der Temperatur des Luftraumes b geschieht durch ein zwischen die Reagirgläser auf den Boden gelegtes Thermometer. Die Seiten und der Deckel a sind durch Filzplatten gegen Abkühlung geschützt. Man kann auch die Thermostate mit der

Einrichtung der Fig. 23 benützen, so dass der besondere Apparat, Fig. 25, wegfällt.

Das Erstarren geschieht bei 65 bis 68°; je höher die Temperatur über 65° steigt, je mehr sie sich der Temperatur von 75° nähert, desto schneller geht das Erstarren vor sich. Aber die Durchsichtigkeit wird um so besser erreicht, je niedriger die Temperatur ist; das Serum wird mit Annäherung an die Gerinnungstemperatur immer undurchsichtiger. Es ist deshalb die Temperatur von 65° möglichst genau innezuhalten und mindestens 68° nicht zu übersteigen. Das Blut verschiedener Thiere erstarrt verschieden schnell, am schnellsten das Hammelblut, am langsamsten das Kalbsblut; im Allgemeinen beträgt die Zeit ½ bis 1 Stunde. Oft ist es angenehmer, das Blutserum in Uhrschälchen oder hohl geschliffenen Glasklötzchen, welche mit einem Glasdeckel bedeckt sind, in relativ dünner Schicht erstarren zu lassen.

Ein richtig zum Erstarren gebrachtes Blutserum ist fest und hart wie hartgekochtes Hühnereiweiss, bernsteinfarbig, durchscheinend und nur in den unteren dickeren Parthieen schwach milchig getrübt.

Das während des Erwärmens an der oberen kühleren Wand des Reagirglases sich bildende Condensationswasser sammelt sich beim Aufrichten des Reagirglases am Boden, Taf. II Fig. 7 und 8, und bildet durch Aufnahme löslicher Substanzen eine Nährlösung, so dass man, Fig. 7, nach der Impfung bisweilen gleichzeitig das Wachsthum auf festem und flüssigem Nährboden beobachten kann, wenn man bis zum Rande der Flüssigkeit impft. Durch Verdunstung trocknet das Serum allmählich von oben anfangend ein, doch bleiben monatelang die mittleren und unteren Parthieen brauchbar.

Löffler[1]) ermittelte, dass Lösungen, welche den Nährwerth des Blutserums erhöhen, in geringer Menge zugesetzt, die Fähigkeit desselben, durchsichtig zu erstarren, nicht herabsetzen, so dass man öfters vortheilhaft statt des reinen Blutserums ein solches gewissermaassen verbessertes Blutserum verwenden kann. Löffler

[1]) Mittheilungen aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. II, 1884. S. 452 und 461.

fügte zu 3 Theilen Blutserum 1 Theil Fleischinfus hinzu. Das Fleischinfus wird nach den S. 244 gegebenen Vorschriften hergestellt, dann fügt man hinzu 1 % Pepton, 1 % Traubenzucker, 0,5 % Kochsalz, kocht auf, neutralisirt mit Natriumcarbonat, kocht auf dem Wasserbade bis zur völligen Ausfällung der Albuminate und filtrirt. Diese Bouillon wird im Dampfkessel sterilisirt und nach dem Abkühlen dem Serum zugesetzt und darauf das Serum mit dem Bouillonzusatze gut gemischt, discontinuirlich sterilisirt und zum Erstarren gebracht. Selbstverständlich kann man auch andere Zusätze machen, z. B. Lösungen von Fleischextract mit Zucker etc. Nach Nocard und Roux ist besonders ein Zusatz von 6 bis 8 % Glycerin zu empfehlen. Das hygroskopische Glycerin beschränkt die Bildung des irisirenden trockenen Häutchens an der Oberfläche des festen Blutserums. Ausserdem muss das mit Glycerin versetzte Blutserum auf 75 bis 78° erwärmt werden, um fest zu werden.

Zur Abkürzung des discontinuirlichen Sterilisirens habe ich[1]) die Beobachtung verwerthet, dass homogen erstarrtes Blutserum, ohne an seiner Durchsichtigkeit merkliche Einbusse zu erleiden, auf ca. 90° bis selbst zu 100° erwärmt werden kann. Ich bringe also das klare Serum sofort, ohne vorausgeschicktes discontinuirliches Erwärmen bei 68, resp. Glycerin-Blutserum bei 75°, zum Erstarren, steigere dann die Temperatur auf 90°, welche ich dann noch eine halbe Stunde einwirken lasse. Mann kann dieses Erwärmen über 75° event. noch 1 bis 2 Mal wiederholen. Die Siedetemperatur selbst ist zu vermeiden, weil die hierbei in Blasenform entweichenden Wasserdämpfe die Blutserumgallerte zerreissen.

Um auch flüssiges Blutserum über 68° zu sterilisiren, hat Unna[2]) dasselbe mit Wasserstoffsuperoxyd und einer 20% Lösung von Natriumcarbonat versetzt. Das Wasserstoffsuperoxyd scheint mir überflüssig, wenn nicht gar hinderlich; dass man aber durch das Natriumcarbonat die Gerinnungsfähigkeit von Blutserum beschränken und schliesslich verhindern kann, ist richtig. Nach einer Tabelle von Taenzer gerinnen 40 gr Ochsenblutserum und 20 gr Wasser-

---

[1]) Centralblatt für Bakteriologie 1887, Bd. I, No. 20.

[2]) Monatshefte für praktische Dermatologie 1886, Bd. 5, No. 9.

stoffsuperoxyd mit 10 gr Natriumcarbonatlösung bei 94°, mit 16 gr bei 102°, mit 18 gr bei 110°, mit 24 gr bei 120° und mit 28 gr überhaupt nicht mehr. Die Hoffnungen, welche Unna an dieses Verfahren knüpfte, dürften sich aber kaum verwirklichen, da nach meinen Versuchen mit mehreren pathogenen Arten, darunter besonders mit Tuberkelbacillen, dieses stark alkalische Medium in dem Maasse weniger zur Kultur brauchbar ist, als es seine Gerinnungsfähigkeit eingebüsst hat. Ich musste deshalb das Verfahren ganz verlassen und wieder zu dem steril aufgefangenen oder discontinuirlich sterilisirten Blutserum zurückkehren. Nach Behring[1]) kann man zu stark alkalisches Blutserum, welches gerade durch seine hohe Alkalescenz zur Kultur von Bakterien nicht geeignet und deshalb leicht steril zu halten ist, nachträglich mit Salzsäure abstumpfen und so wieder zu einem geeigneten Nährboden machen. Um etwaigen Gefahren eines zu hohen Kochsalzgehaltes, der sich dabei einstellt, zu begegnen, verdünnt Behring dieses stark alkalische Serum vor dem Zusatz der Salzsäure mit 3 bis 4 Theilen sterilisirtem Wasser. Dieses Serum ist für viele Bakterien sehr geeignet, ob auch für Tuberkelbacillen, habe ich noch nicht versucht.

Statt Blutserum verwendet man in derselben Weise auch vortheilhaft die keimarmen oder keimfreien serösen Transudate der Pleura- und Peritonealhöhle oder Hydroceleflüssigkeit.

Um solche Lösungen, welche wie Blutserum und flüssiges Eiweiss beim Aufkochen gerinnen, mit Gelatine zu verbinden und so Blutserum-Gelatine zu gewinnen, verfährt man unter kleiner Verbesserung eines von Koch[2]) angegebenen Verfahrens so, dass man das Blutserum in der angegebenen Weise entnimmt und das an sich sterile oder discontinuirlich sterilisirte Blutserum nach Erwärmung auf 37° mit der gleichen Menge einer neutralen bereits sterilisirten, bei 30 bis 40° verflüssigten Gelatinelösung mischt. Diese für sich bereitete Gelatinelösung muss selbstverständlich doppelt so stark genommen werden, als die definitive Lösung betragen soll, weil sie ja zur Hälfte mit dem Blutserum wieder verdünnt wird. Die Gelatine-

[1]) Zeitschrift für Hygiene 1889, VI, S. 468.

[2]) Mittheilungen aus dem K. Gesundheitsamte 1881, Bd. I, S. 27.

lösung wird mit Wasser allein angesetzt, wenn man nur den Nährwerth des Blutserums berücksichtigen will. Für manche Fälle kann man aber auch die Gelatine mit Bouillon, Pepton, Zucker etc. verbinden, um eine nährkräftigere Gelatine zu erzielen.

Nach dem Mischen des Blutserum mit der Gelatine kann man der Vorsicht halber noch einige Mal einige Tage nach einander je ein bis zwei Stunden auf 52° erwärmen.

Um Blutserum-Agar-Agar zu gewinnen, kann man gleiche Mengen sterilisirtes nach Unna alkalisirtes Blutserum und 2% sterilisirte Agar-Agarlösung nach Verflüssigung der letzteren vermischen. Diese Mischung nach Unna verträgt höhere Temperaturen bis zur Siedetemperatur, so dass man das Sterilisiren und Verflüssigen bei höherer Temperatur bewirken kann.

Von Reisenden war schon gelegentlich erwähnt worden, dass das Eiweiss der Eier mancher Vögel bei 75° nicht hart und undurchsichtig wird. So theilt z. B. R. Marloth[1]) von den Eiern einer kleinen Pinguinenart von Angra-Pequena mit: „das Eiweiss hat die Eigenthümlichkeit, dass es beim Kochen gallertartig und durchscheinend wie Gelatine bleibt“. Dies scheint allgemein vom Eiweiss der Vogeleier von Nesthockern im Gegensatz zu dem der Nestflüchter zu gelten und hierauf basirten Schenk[2]) und dal Pozzo[3]) ein Verfahren, das Eiweiss der Kibitzeier wie Blutserum zu verwenden. Das Ei wird äusserlich sorgfältig gereinigt und die zunächst ausfliessende äussere dünnflüssige Eiweismasse in einem sterilisirten Gefässe aufgefangen. Hierzu wird ein Viertel Volumen sterilisirtes destillirtes Wasser zum Verdünnen zugefügt. Nach Bedarf kann man Pepton, Glycerin, Zucker etc. hinzufügen. Nach dem Vermischen wird die Masse in Reagirgläser gefüllt und discontinuirlich sterilisirt. Dann kann man die Eiweissmasse schräg zum Erstarren bringen. Nach Untersuchungen in meinem Laboratorium ist ein ganz intactes Eiweis als Nährboden durchaus nicht mit einem durch Hitze sterilisirten oder gekochten Eiweiss gleichwerthig und deshalb

---

1) Deutsche Rundschau 1887. S. 404.
2) Allgem. Wiener med. Zeitung 1887, No. 18.
3) Medicinische Jahrbücher 1887, S. 523.

empfiehlt es sich, wenn man Eiereiweiss verwenden will, auch hier das sterile Gewinnen des Eiereiweisses in Zukunft mehr zu beachten. Man muss nur[1]) die Schale der Eier äusserlich gründlich mechanisch reinigen, dann mit Sublimat abwaschen, mit sterilisirtem Wasser abspülen und äusserlich trocknen und das Oeffnen der Schale mit vorher geglühtem Messer bewirken. In derselben Weise kann man auch das Eigelb steril auffangen.

Tarchanoff und Kolessnikoff[2]) verwandeln das durch Kochen undurchsichtig erstarrende Hühnereiweiss in durchsichtiges, indem sie die Eier in 5 bis 10 % Lösungen von Kalihydrat einlegen. Nach 4 tägigem Liegen wird das veränderte Eiweiss zur Hälfte mit Wasser verdünnt, in Reagirröhrchen eingefüllt und liefert so a) ein halbfestes syrupartiges Alkalialbuminat. Zu 10 % in Wasser gelöst, liefert es b) eine flüssige Albuminat-Bouillon; beide a und b können im strömenden Dampfe sterilisirt werden ohne fest zu werden. Dasselbe 4 tägige Hühnereiweiss wurde bei 105° nach 15 Minuten opalisirend, blieb aber auch bei allmählichem Erstarren noch durchscheinend. Nach 14 tägigem Liegen in der Kalilauge wurde das Eiweiss fest, gelatineartig, gelblich, durchsichtig und konnte durch Dämpfe sterilisirt werden. Rosenthal und Schulz[3]) pressen zum selben Zwecke das frische Hühnereiweiss durch eine doppelte Lage Musselin; darauf setzen sie in einem mit eingeschliffenen Stopfen versehenen Messcylinder zu dem klaren, von Luftblasen freien Eiweiss 1 %ige Natron- oder Kalilauge und destillirtes Wasser zu und zwar auf 5 ccm Eiweiss 3 bis 2,4 ccm Alkalilösung und 2 bis 2,6 ccm Wasser. Die Masse wird im Verlaufe einiger Stunden durch wiederholtes vorsichtiges Hin- und Herbewegen gemischt und in Gläser eingefüllt. Bei 95 bis 98° gerinnt diese alkalische Eiweisslösung zu einer klaren, durchscheinenden Gallerte. Bei Verwendung von 1,5 bis 1 %igen Salzlösungen (Kochsalz, Chlorkalium, Natriumkarbonat, Natriumsulfat, Natriumphosphat) statt des reinen Wassers, kann der Alkaligehalt geringer sein, was auf jeden Fall mit Rück-

---

1) Centralblatt für Bakteriologie 1888, Bd. 4, No. 3.

2) Russkaja Medicina 1887, No. 11. Zeitschrift für wissenschaftl. Mikroskopie 1887, Bd. 4, S. 406. Referat von Heydenreich.

3) Biologisches Centralblatt 1888, No. 11.

sicht auf meine ungünstigen Erfahrungen mit Unna's stark alkalischem Blutserum zu beachten ist. Aehnlich wirkt auch die kochsalzhaltige Normalbouillon, wenn sie zur Hälfte mit Wasser verdünnt wird. Man kann deshalb auch Eiweiss-Lösungen, welche aber sämmtlich das Kochen nicht vertragen und bei ca. 95° erstarren, derart gewinnen, dass man zu 5 ccm Eiweiss 2,2 ccm Alkalilösung und 2,8 ccm Salzlösung oder Fleischinfus zusetzt.

Das durchscheinend erstarrte Blutserum, die analogen Transsudate und das an sich durchscheinende oder durch Alkalibehandlung durchsichtig gemachte Eiweiss sind gerade so wie die erstarrten Nährgelatinen oder Agar-Agarlösungen feste durchsichtige Nährböden, aber sie unterscheiden sich zu ihrem Nachtheil dadurch von den letzteren, dass, wenn sie aus dem Zustande der Lösung in den der Erstarrung übergeführt sind, sie nicht mehr nach Belieben in den Zustand der Lösung zurückgeführt werden können. Aber sie haben immerhin auch im festen Zustande den Vortheil der Durchsichtigkeit und gewähren damit die Möglichkeit einer mikroskopischen Durchmusterung.

Das in gewöhnlicher Weise durch Kochen erstarrte Blutserum und das ebenso gewonnene harte, weisse Eiweiss der Eier von Haushühnern dagegen sind feste und undurchsichtige Nährmedien.

Dasselbe gilt von dem durch Bockhart[1]) eingeführten und für viele Arten von Bakterien als Nährboden empfohlenen, durch strömende oder gespannte Dämpfe sterilisirten Fleisch.

Als Typus dieser Kategorie von Nährsubstraten müssen aber die von J. Schröter[2]) in die Bakteriologie eingeführten Kartoffeln angesehen werden. Koch[3]) hat dieses Medium später noch allgemeiner verwerthet. Die mit der Schale versehenen Kartoffeln werden durch Bürsten gründlich von dem groben Schmutze befreit, dann werden sie zur Vernichtung der der Schale anhaftenden Sporen, besonders der sog. Kartoffelbacillen, Taf. I Fig. 2 (c u. d), einige

---

[1]) Tageblatt d. 60. Naturforscher-Versammlung 1887, S. 347.

[2]) Cohn's Beiträge zur Biologie der Pflanzen 1872, Bd. I, Heft 2, S. 109.

[3]) Mittheilungen a. d. K. Gesundheitsamte 1881, Bd. I.

Minuten mit einer 1 % Sublimatlösung abgewaschen und dann eine halbe bis eine Stunde in eine 1 p. M. Sublimatlösung gelegt. Hierauf werden dieselben mit Wasser gründlich abgespült und im strömenden Dampfe 2 Stunden gekocht. In der Regel wird eine Wiederholung des Kochens wünschenswerth. Im gespannten Dampfe erfordert das Kochen ca. ½ Stunde.

Während des Abkühlens bereitet man sich feuchte Kammern. Grössere Glocken von der Form der Fig. 26 werden mechanisch gereinigt und mit 1 p. M. Sublimat ausgespült. Auf den Boden der Glocke bringt man eine mehrfache Lage von Fliesspapier, welches mit 1 p. M. Sublimatlösung angefeuchtet wird. Sind die Kartoffeln abgekühlt, so werden sie mit der linken, durch 1 p. M. Sublimat sterilisirten Hand zwischen Daumen und Zeigefinger gefasst, mit einem sterilisirten aber wieder abgekühlten Messer durchschnitten und mit der Schnittfläche nach oben in die feuchte Glocke eingelegt. Als Messer verwendet man gewöhnliche Küchenmesser, welche vorher durch Ausglühen in der Flamme sterilisirt werden und gegen Staub geschützt wieder abgekühlt sind; für jede Kartoffel benutzt man ein frisches Messer. Eine Glocke kann 4 bis 6 Kartoffelhälften aufnehmen.

Fig. 26.



Bei dem relativ geringen Schutze unter den Glocken, hatte Koch für längere Beobachtungen cylindrische Gläser genommen, auf deren Boden nur eine halbe Kartoffel zu liegen kam; die Oeffnung der Gläser wurde mit Watte verschlossen.

Eine andere Verbesserung aus dem Koch'schen Laboratorium, welche ich bereits in der 1. Auflage angegeben hatte, bestand darin, dass man statt der Kartoffelscheiben zerriebene Kartoffeln verwendete. Zu diesem Zwecke bringt man die gekochten und darauf zerriebenen Kartoffeln in Kölbchen (am besten sogenannte Erlenmeyer'sche Kölbchen), fügt so viel Wasser zu, dass ein dicker Brei entsteht und sterilisirt diesen Kartoffelbrei im Dampfapparat. Diesen Kartoffelbrei kann man durch Zusatz von Stärke, Zucker, Pepton,

Fleischextract zu einem sehr guten Nährboden für viele Bakterien machen.

Statt der Kolben verwendeten Soyka[1]) und Eisenberg[2]) Glasdosen von ca. 5 bis 6 cm Durchmesser und 3 cm Höhe, auf welche ein Deckel so aufgeschliffen ist, dass ein hermetischer Verschluss bewirkt werden kann.

Esmarch[3]) schält die Kartoffeln mit nicht sterilisirtem Küchenmesser und beseitigt so von vornherein die gefahrbringe Schale, spült sie dann unter der Leitung ab. Die geschälte Kartoffel wird dann in 1 cm dicke Scheiben zerlegt, die man nach der Grösse der zur Aufnahme bestimmten kleinen Krystallisationsschalen abrundet. Diese Schälchen mit je einer Kartoffelscheibe werden mit einem zweiten übergreifenden Schälchen überdeckt und dann das Doppelschälchen mit der darinliegenden Kartoffelscheibe im Dampfe sterilisirt. Solche fertige Schalen mit sterilisirter Kartoffel kann man sehr leicht vorräthig halten.

Fig. 27.

So bequem und sicher nun auch schon die Kartoffelkulturen bei Verwendung von Kartoffelbrei und nach der Esmarch'schen Methode erscheinen, so werden dieselben doch noch an Handlichkeit übertroffen, wenn man die Kartoffeln in Reagirgläser einbringt. Derartige Verfahren wurden kurz nacheinander von verschiedener Seite mitgetheilt. M. Bolton[4]) schnitt aus einer geschälten Kartoffel mit einem Apfelstecher oder einem grossen Korkbohrer, dessen Durchmesser etwas kleiner sein muss als der des Reagirglases, cylindrische Stücke aus. Zur Erzielung einer möglichst grossen Oberfläche wird der Kartoffelcylinder schief abgeschnitten oder nach Globig[5]) noch einfacher durch einen schrägen Längsschnitt der

1) Centralblatt f. Bakteriologie 1887, Bd. I, No. 18.
2) ibid. 1888, Bd. III, No. 7.
3) ibid. 1887, Bd. I, No. 1.
4) Medical News 1887, S. 318.
5) Zeitschrift für Hygiene 1887, Bd. III, S. 294.

Cylinder in zwei gleiche Segmente zerlegt, so dass man gleich Material für zwei Reagirgläser erhält.

Aus Pasteur's Laboratorium theilte Roux[1]) ein derartiges Verfahren mit. Roux verengert das Reagirglas Fig. 27 unten etwas, so dass sich das austretende Wasser im Raume a sammelt und die Kultur nicht berührt und gleichzeitig für die Kartoffelscheibe k an der Verengerung ein Stützpunkt gewonnen wird. Ich selbst nehme zu diesem Zwecke ein gewöhnliches Reagirglas, gebe aber auf den Boden etwas sterilisirte Watte. Günther[2]) bringt ein 2 cm langes Glasröhrchen als Stütze für die Kartoffel auf den Grund des Reagirglases, um die Berührung mit dem Condenswasser zu vermeiden. Um Kartoffeln in durchscheinender Form zu verwenden, kann man nach G. Wood aus recht weissen Kartoffeln feine Scheiben schneiden, welche auf sterilisirte Glasstreifen fest angedrückt und mit diesen Glasstreifen in Reagirgläser eingebracht werden. Das Sterilisiren erfolgt am besten im gespannten Dampfe.

Kartoffeln haben vor anderen Wurzeln, wie Mohrrüben, und vor Früchten, wie Aepfeln, den Vorzug einer weisslichen bis gelblichweissen Farbe, auf welcher Eigenthümlichkeiten der Kulturen sich gut erkennen lassen.

Für Pilzkulturen ist zerriebenes Brod, welches mit Wasser zu einem Brei angerührt wird, und Reis, der mit etwas Wasser zum Quellen gekocht wird, ein vorzüglicher Nährboden. Soyka verwendet, um einen schönen weissen, nährkräftigen Boden zu bekommen, eine Mischung von 10 gr Reismehl, 15 ccm Milch und 5 ccm neutraler Bouillon. Schill[3]) verwendet Oblaten, die angefeuchtet werden. Diese Substanzen werden sämmtlich im strömenden oder gespannten Dampfe sterilisirt.

Man muss in jedem Laboratorium immer ganz reines, sicher sterilisirtes destillirtes Wasser zur Hand haben. Plaut[4]) versieht zu diesem Zwecke seine Spritzflasche, deren kürzerer, unter

---

1) Annales de l'Institut Pasteur 1888, Bd. II, S. 28.

2) Deutsche med. Wochenschrift 1889, No. 20.

3) Centralblatt für Bakteriologie 1889, V, No. 10.

4) Centralblatt für Bakteriologie 1888, Bd. III, No. 3/4 und 1888, Bd. IV, No. 5.

dem Gummipfropf endigender Schenkel am freien Ende einen Wattepfropf trägt und deren einzelne Theile vorher sterilisirt waren, mit einem Gebläse. Der andere bis auf den Boden des Wassers reichende, zum Austritt des Wassers bestimmte Schenkel ist an seinem freien Theile mit einem Quetschhahn versehen, den man schliesst, bevor der Wasserstrahl aufgehört hat zu fliessen, so dass von aussen nichts ins Wasser der Flasche aspirirt werden kann. Ich ziehe folgende von Forster[1]) angegebene Einrichtung vor. In dem Gummipfropf, Fig. 28, P_1 steckt die kürzere Röhre z, welche den Wattepfropf w_1 trägt und mit dem Handgebläse g in Verbindung gebracht wird. Der längere Schenkel a tritt durch einen Gummipfropf P_2, welcher gleichzeitig die Glasröhre G hält. Diese ist mit dem Wattepfropf w_2 geschlossen, sodass die innere Oeffnung o des Glasrohres a gegen die Luftinfection geschützt ist. Die einzelnen Theile der Flasche werden für sich sterilisirt, dann schnell zusammengesetzt und darauf das destillirte Wasser in die Flasche Fl eingefüllt oder ev. das Wasser direct in die Flasche Fl hineindestillirt. Darauf wird das ganze nochmals im Dampf sterilisirt, wobei man nur darauf achten muss, dass die Oeffnung o etwas höher steht, als die Flüssigkeit in der Flasche. Zum Gebrauche wird der Watteptropf w_2 abgenommen, durch Druck auf das Gebläse das Wasser in ein unter o gehaltenes Gefäss eingefüllt und der Wattepfropf wieder eingesetzt ehe Luft aspirirt werden kann. In dieser Weise halte ich destillirtes Wasser und Bouillon, die beiden am häufigsten gebrauchten Flüssigkeiten, in vollständig reinem und sterilisirtem Zustande vorräthig.

Fig. 28.



[1]) Archiv für Hygiene, 1885, III, S. 468.

3. Das Inficiren oder Impfen der sterilisirten Nährsubstrate.

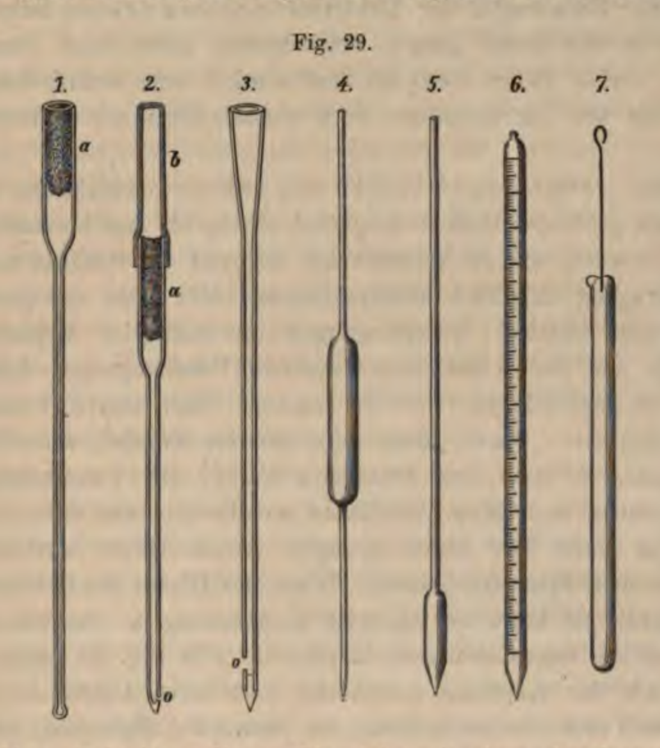
Als Resultat der bisherigen Bemühungen besitzen wir nunmehr sterile resp. sterilisirte Nährmedien in sterilisirten und mit sterilisirtem Verschlusse versehenen Gefässen. Es stehen uns undurchsichtige Lösungen, wie Milch zu Gebote; oder durchsichtige Lösungen wie die Normalsalzlösungen, Normalbouillon, Würze, Molke, Blutserum; oder durchsichtige Medien, welche wir nach Wunsch in Form von Flüssigkeiten oder festen Substraten verwerthen können, wie die Nährgelatine oder Agar-Agargallerte; oder durchscheinende feste Substrate, wie festes Blutserum und durchsichtiges Eiweiss; oder feste undurchsichtige Medien, wie hartes Eiweiss, Reis, Kartoffeln. Für die Praxis des Uebertragens in oder auf diese Nährsubstrate können wir aber besser zwei grosse Gruppen unterscheiden, A. solche, welche Flüssigkeiten enthalten und zwar, welche a) ganz flüssig sind oder b) doch wenigstens Condensationswasser haben, und B. solche, welche ganz feste Körper enthalten.

Zum Uebertragen einer Kultur, deren Herkunft uns zunächst noch gleichgiltig sein soll, werden bei übergebundenen Papier- oder Leinwand- oder Gummikappen diese zunächst abgenommen und zur Seite gesetzt. Dann wird der Wattepfropf, der in diesem Falle nicht beschmutzt oder bestaubt sein kann, mit geglühter, aber wieder abgekühlter Pinzette durch Drehen gelockert und bei möglichst schräger Haltung der Gläser mit der Pinzette so bei Seite gesetzt, dass er nicht beschmutzt werden kann. Man kann auch den Pfropf mit der Pinzette lockern, etwas vorziehen und ihn dann bei schräger Haltung des Glases mit den Fingern herausheben. Bei einfachem Watteverschluss wird derselbe, besonders wenn die Gläser schon einige Zeit gestanden haben, erst in der Flamme erhitzt resp. verkohlt, wobei man besonders die Ränder der Gläser, zwischen denen und der Watte sich der Staub besonders festsetzt, gehörig erhitzen muss. Nachdem man dann die brennende Watte mit der Pinzette durch Drücken ausgelöscht hat, lockert man den Pfropf und setzt

ihn mit der Schieberpinzette zur Seite oder nimmt ihn mit den Fingern ab, wobei immer das Glas möglichst schräg gehalten werden muss. Bei den Pasteur'schen Verschlüssen öffnet man die Gefässe durch Abheben des Helmes B, Fig. 10 (1 u. 2), bei dem Salmon'schen Verschlusse wird zum Inficiren der Ventilator C, Fig. 10 (3), S. 204, abgenommen.

Nachdem auf diese Weise das Gefäss geöffnet ist, wird die mikroorganismenhaltige Flüssigkeit übertragen. Zum Uebertragen

Fig. 29.



aus Flüssigkeiten dienen Glasstäbe mit eingeschmolzenem, zur Oese gebogenem Platindraht, Fig. 29 (7); zur Kapillare ausgezogene Glasröhrchen, Fig. 29 (1); dieselben erhalten oben einen Pfropf von Asbest oder Watte und können unten zugeschmolzen werden, so dass man sie nach vorausgegangenem Glühen in der Flamme erst in der zu entnehmenden Flüssigkeit abbricht. Zur Füllung muss man entweder bei a saugen oder man befestigt über a einen Gummiballon

oder ein geschlossenes Gummiröhrchen, Fig. 29 (2, b), wie sie an den Augentropfgläsern üblich sind. Fol giebt der Kapillare nicht unten, sondern seitlich die Oeffnung, Fig. 29 (2 und 3 bei o); für bestimmte Zwecke verwendet er stählerne Trocarts mit unterer seitlicher Oeffnung. Bisweilen bedarf man zu Uebertragungen auch Pipetten, Fig. 29 (4, 5), von verschiedener Form, oder Büretten (6), welche je nach dem Zwecke mit oder ohne einen der geschilderten Verschlüsse verwendet werden.

Zum Uebertragen der Bakterien etc. von festen Substraten dienen in der Regel gerade Platindrähte. Alle diese Utensilien waren vorher sicher sterilisirt und wurden, wenn erforderlich, unmittelbar vor der Entnahme noch einmal durch die Flamme gezogen.

Das Uebertragen in Flüssigkeiten geschieht nun derart, dass die geöffneten Gefässe möglichst schräg bis fast horizontal gehalten werden, um die Luftinfection während des Oeffnens und der Uebertragung möglichst auszuschliessen. Man kann zur grösseren Sicherheit derartige Uebertragungen im keimfreien Raume vornehmen und man muss immer mehrere Uebertragungen derselben Art zur gegenseitigen Controlle machen. Man überträgt eine nur eben sichtbare „Spur", einen oder mehrere Tropfen, einen Cubikcentimeter, je nach dem besonderen Falle. Bei Verwendung von Oesen muss man durch Andrücken an die Glaswand dafür sorgen, dass sie wieder leer heraus gezogen werden, ebenso streicht man den geraden Platindraht an der Wand des Glases im Bereiche der Flüssigkeit ab, um sicher Material hineinzubringen. Bei fein ausgezogenen und zugeschmolzenen Kapillaren, 1 in Fig. 29, bricht man das Ende der Kapillare gewöhnlich erst durch Aufstossen an die Glaswand oder den Gefässboden im Innern der Flüssigkeit ab, um die Impfflüssigkeit austreten zu lassen.

Nach dem „Impfen" oder „Inficiren" der sterilen Nährlösung wird der Glasstab oder die Capillare etc. schnell herausgezogen und der Verschluss wieder fest aufgesetzt, während das Glas noch schief gehalten wird. Dann stellt oder hält man das Glas wieder aufrecht und vertheilt das Impfmaterial durch Hin- und Herbewegen oder Schütteln und stellt dann erst die inficirten Gläser an ihren definitiv

bestimmten Platz bei Zimmertemperatur oder Brüttemperatur bei Seite.

Bei dem Fol'schen Verschlusse, Fig. 9 (2 und 3) S. 203, wird der Wattebausch b abgenommen und dann der Stahltrocart, Fig. 29 (3), Fig. 9 (3, c) durch den Asbestbausch a, Fig. 9 (2, 3) und durch die dünne Wattelage w durchgestossen. Nach Herausziehen des Trocarts wird der Wattepfropf b wieder fest aufgesetzt.

Das Uebertragen auf feste, schräg erstarrte Substrate mit Condensationswasser geschieht gleichfalls bei möglichst horizontaler Haltung der Gläser. Das Impfen erfolgt in diesen Fällen in der Regel zur Erzielung eines Oberflächenwachsthums. Man muss deshalb das in einer Oese oder mit geradem Platindraht aufgenommene Material, indem man die Oese oder den Platindraht vorwiegend strichförmig fest aufdrückt, weniger, indem man das Substrat ritzt, vom Grunde bis zur Spitze der erstarrten Masse mehr auf- als eintragen: **Strichkultur.** Das Uebertragen auf feste, schräg erstarrte Substrate ohne Condensationswasser geschieht ebenso, nur wird dabei die Oeffnung des Glases nach Abwärts gehalten, wie bei den folgenden Stichkulturen.

Fig. 30.



Bei gerade erstarrten Substraten, welche kein Condensationswasser haben, verfährt man folgendermaassen: Das mit erstarrter, sicher sterilisirter Nährgelatine versehene Reagirglas bedarf keiner anderen Vorbereitung, als dass der Wattepfropf durch Drehen mit geglühter Pinzette zum schnellen Oeffnen gelockert wird. Die linke Hand fasst darauf das Glas so, dass die Oeffnung nach unten sieht; dann wird mit dem vierten und fünften Finger der rechten Hand oder mit der Pinzette der Wattepfropf abgenommen und mit dem Platindraht des zwischen rechtem Daumen und Zeigefinger gefassten Glasstabes ein oder mehrere Stiche in die Gelatine gemacht, Fig. 30. Zum Schlusse wird, noch während die Oeffnung nach unten gerichtet ist, der Wattepfropf wieder fest eingestetzt.

Eine solche **Stichkultur** in feste Gelatine ist wohl die ideale Form einer reinen Uebertragung, da eine unbeabsichtigte

Nebenwirkung fast unmöglich erscheint, und hierin liegt auch in allerersten Linie der Erfolg der Koch'schen Methodik bei der ersten Einführung der durchsichtigen festen Nährböden begründet.

Bei den übrigen festen Nährböden sucht man die Uebertragung in ähnlicher Weise zu machen, indem man die Oeffnungen der Gläser während des Oeffnens und Zustopfens nach unten hält, wenn es der Inhalt bei Fehlen von Wasser, wie bei Kartoffel- oder Brodbrei oder Kartoffelscheiben in Reagirgläsern, gestattet. Bei Kartoffelscheiben in grossen oder kleinen Glocken und ebenso bei Kartoffelbrei in Doppelschalen öffnet man die obere Schale möglichst wenig und impft dann schnell, indem man die Oberfläche mit dem inficirten Platindraht punkt- oder strichförmig ritzt oder indem man mit Platinöse oder Messer die Impfmasse mehr auf die Mitte der Oberfläche verreibt.

Einige Zeit nach der Infection macht sich das Wachsthum der übertragenen Keime in oder auf den Substraten bemerkbar.

Die sterilisirte Milch gestattet trotz der Undurchsichtigkeit manche Eigenthümlichkeit sehr schnell zu erkennen.[1]) A. sie ändert sich für das Auge nicht; B. sie ändert sich. Es tritt Gerinnung ein a) unter Säurebildung; die Gerinnung ist gelatinös oder fein- oder grobflockig. Es bleibt bei der Gerinnung oder auf die Gerinnung folgt eine Lösung des geronnenen Kaseïns; die Reaction bleibt dabei sauer oder wird neutral oder alkalisch; b) es tritt Gerinnung ohne Säurebildung ein, dieselbe erfolgt schnell oder langsam, unvollständig oder vollständig; c) Gerinnung tritt ein, wenn man durch kohlensauren Kalk jede Säurebildung verhindert, oder dieselbe erfolgt nur, wenn man die Reaction vor dem Impfen absichtlich schwach alkalisch macht; auf diese labähnliche Gerinnung folgt keine, oder schwache, oder intensive und schnelle Lösung des ausgeschiedenen Kaseïns. Die Reaction bleibt oder wird alkalisch. C. Die Veränderung erfolgt unter Eintritt alkalischer Reaction, die Milch wird gelblich durchscheinend, gelatinös. Die Farbe der ganzen Milch

---

[1]) cfr. meine Untersuchungen in den Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte II, 1884, S. 309, und Deutsche med. Wochenschrift 1884, No. 48 bis 50;

Duclaux: Annales de l'Institut National Agronomique 1882, S. 22.

kann weiss bleiben oder sich verändern, oder es bilden sich auf der Oberfläche Pigmente.

Nach Petruschky[1]) kann man besonders gut auch die Säure- oder Alkalibildung in genau neutraler Molke (S. 245), von welcher 100 ccm mit ca. 5 ccm neutraler Lackmuslösung (S. 256) versetzt sind, zu differenzialdiagnostischen Zwecken verwenden. Man füllt diese gefärbte Molke zu 5 bis 10 ccm in Reagirgläser und titrirt mit $^1/_{10}$ Normal-Natronlauge oder Salzsäure zurück, nachdem das Wachsthum ad maximum gelangt ist. So sind z. B. in dieser Milchzuckerlösung die Bakterien von Typhus, Milzbrand, Septikaemia haemorrhagica, Milchsäuregährung Säurebildner, die der blauen Milch, des Schweinerothlaufes und der amerikanisch-nordischen Schweinepest Alkalibildner. Petruschky glaubte die Beobachtung, dass hierbei Typhusbacillenculturen 2 bis 3 % Natronlauge erfordern, zur Differentialdiagnose gegenüber ähnlich wachsenden Arten verwerthen zu können. Th. Smith[2]) macht mit Recht darauf aufmerksam, dass man derartigen Versuchen nicht zu viel trauen dürfe, weil die Säurebildung wesentlich vom Nährboden abhänge, und manche Bakterien, welche oben als Alkalibildner auftreten können, sind z. B. in anderen Zuckerlösungen Säurebildner, und Säurebildner in obigem Sinne können in eiweisshaltigen Substraten Alkalibildner sein, während Milzbrand auch in solchen als Säurebildner auftritt. Wie man die Säurebildner durch Bindung der Säure durch Zusatz von Kalk zu intensivem Wachsthum zwingen kann, so kann man auch Alkalibildner obiger Reihe (d. h. in Lösungen mit Milchzucker) durch Zusatz von Dextrose oft zu besserem Wachsthum anregen, indem dieselben aus dieser Zuckerart Säure bilden, welche das Alkali bindet.

Die durchsichtige Bouillon lässt manche charakteristische Eigenthümlichkeiten erkennen, welche sich zur Differentialdiagnose verwerthen lassen. Von diesen Wachsthumsmerkmalen führe ich einige nach Miquel's Zusammenstellung an:

A. Die Bouillon bleibt klar, aber man erhält Niederschläge. Dieselben können gefärbt sein, weiss, gelb, grün, roth etc. Die

---

[1]) Centralblatt für Bakteriologie 1889, VI, No. 23 bis 24.

[2]) Ibid. 1890, VII, No. 13.

Niederschläge sind schwach oder reichlich, pulvrig oder klebrig, klumbig oder in bestimmter Weise in Streifen, Ringen etc. angeordnet.

B. Die Bouillon trübt sich schwach oder stark. Die Trübung bleibt oder verschwindet; die Flüssigkeit klärt sich, es bilden sich Wolken oder Niederschläge. Die schleierartigen Wolken sind dünn, glatt oder gefaltet, membranartig, irisirend, gleichmässig etc. Die Bouillon bewahrt ihre ursprüngliche Farbe oder ändert sie und nimmt verschiedene Farben an; sie bewahrt ihre Flüssigkeit oder wird klebrig, fadenziehend; sie ändert ihre Reaction und wird bald sauer, bald alkalisch, entwickelt bestimmten Geruch.

Um die Entwicklung von Schwefelwasserstoff schnell beobachten zu können, tränkt man kleine Streifen Filtrirpapier in alkalischer Lösung von Bleiacetat und hängt diese Bleipapierstreifen in die obere Oeffnung des Gefässes, so dass ihr oberer Abschnitt von dem Wattepfropf beim Einsetzen desselben festgehalten wird.

Aehnlich wie bei der Bouillon sind die Wachsthumseigenthümlichkeiten bei den anderen durchsichtigen Lösungen, Normalsalzlösungen, Würze, Blutserum sehr verschiedenartig.

Bei den schräg erstarrten, durchsichtigen Medien, wie Blutserum, Gelatine und Agar-Agar, beobachtet man vor allem die besonderen Formen bei der Ausbreitung der Strichkultur (Taf. II. Fig. 7 und 8) auf der Oberfläche in Form von schleierartigen, grauweissen bis weissen Belegen oder von derberen, dicken, glatten oder gefalteten Membranen. Dieselben färben sich in verschiedenen Farben und oft beobachtet man, wie der umgebende, noch nicht überwachsene Theil des Mediums Farbenveränderungen zeigt, welche sich viel weiter erstrecken, als das directe Wachsthum reicht. Bei Blutserum und Gelatine bleibt vielfach die Consistenz unverändert, aber manche Arten schmelzen das Substrat mehr oder weniger schnell ein und verwandeln dadurch den festen Nährboden in eine trübe Flüssigkeit.

---

[1]) Annuaire de l'observatoire de Montsouris pour l'an 1885, S. 578.

Bei den gerade erstarrten, gelatinirenden Medien ist das Schicksal einer Stichkultur je nach den verimpften Bakterien ein sehr differentes. Als allgemeiner Anhalt mögen folgende Daten dienen. Bei den die Gelatine nicht verflüssigenden Bakterien (Taf. II. Fig. 5; Fig. 31 a) bildet sich das charakteristische Oberflächenwachsthum von der Einstichöffnung derart aus, dass bald flache oder stärker prominirende Köpfchen entstehen, welche in Verbindung mit dem Impfstiche der Kultur das Aussehen eines Nagels verleihen, „Nagelkulturen" von Friedländer; statt eines solchen, mit dem Nagelkopf vergleichbaren köpfchenähnlichen Wachsthums, wachsen andere auf der Oberfläche in Form concentrischer Ringe, oder blatt- oder traubenförmiger Gebilde. Einzelne zeigen intensives Oberflächenwachsthum und mangelhaftes Wachsthum in dem Impfstiche, bei anderen verhält es sich gerade umgekehrt. Die Kulturen erscheinen bald trocken, bald schleimig, andere sind glänzend, andere durchscheinend. Die Farben der Kulturen sind höchst different; die Gelatine selbst verändert bald die Farbe, bald nicht; oft tritt ein besonderer Geruch auf. Alle diese kleinen morphologischen und biologischen Differenzen sind zu beachten, weil sie die Differentialdiagnose erleichtern.

Fig. 31.



Bei den die Gelatine verflüssigenden Bakterien (Taf. II. 6; Fig. 31 b und c) geschieht dies zum Theil ganz allmählich, so dass die Gelatinekultur ein leicht trichterförmiges Ansehen gewinnt, Fig. 31 b, bei anderen schneller; es entstehen dabei breitere Trichter, oder die Verflüssigung schreitet mehr schichtenweise vor sich. Bald bilden sich Häutchen an der Oberfläche, bald nicht; oft sieht man an der Grenze zwischen verflüssigter und noch fester Gelatine, x der Fig. 31 c, die Kultur in Form von verschieden gestalteten Wolken vorwärts schreiten, Taf. II, Fig. 6. Bisweilen scheint die Verflüssigung streng an das Fortschreiten der Vegetation gebunden, manchmal ihr vorauszueilen, als ob verflüssigende Stoffe, Enzyme, von den Bakterien producirt würden, welche weiter wirken als das sichtbare Wachsthum reicht. Auch

bei den verflüssigenden Bakterien können die Kulturen verschiedene Farben bilden und die Gelatine kann selbst Farbenveränderungen erleiden; es können Gerüche auftreten. Auch diese Differenzen sind sämmtlich zu beachten.

Weiter zeigt sich, dass manche Bakterien bei ihrem Wachsthum Gase bilden, welche die Gelatine zerreissen. Noch mehr ist dies bei Agar-Agar der Fall. Bei dem gewöhnlichen sind die Farbbildungen an der Oberfläche meist deutlich ausgesprochen, während sie bei Glycerin-Agar undeutlicher werden. Bei Agar treten die aus der Verflüssigung der Gelatine sich ergebenden, wichtigen, vielerlei kleinen Unterschiede nicht auf, da keine der bis jetzt untersuchten Bakterien im Stande ist, festes Agar-Agar zu verflüssigen. Chemisch ist ausserdem zu beachten, dass die künstliche Gelatine nach Petri[1]) Nitrate enthält, welche sich aber auswaschen lassen; wegen anderer chemischer Differenzen cfr. S. 250.

Die in Stärkelösungen zu beobachtenden Wachsthumsmerkmale sind ebenfalls sehr verschieden und zur Diagnose der Species ist besonders zu beachten, dass manche Bakterien Stärke hydratisiren und einige den so entstandenen Zucker weiter in Säuren überführen, so dass man auf das Eintreten der Zuckerreaction und auf das Auftreten sauerer Reaction zu achten hat.

Auf Kartoffeln und auf Kartoffeibrei spielt die Art der Kartoffeln und der Grad der saueren Reaction des Mediums eine grosse Rolle und hierauf ist es oft allein zurückzuführen, dass manche Beobachter von Wachsthum sprechen, wo andere nichts beobachtet haben. Dieselben- Bakterien können auf einzelnen Kartoffelarten nicht oder nicht deutlich sichtbar wachsen, während sie auf andern ein mässiges und wieder auf andern ein üppiges Wachsthum zeigen. Ebenso bemerkt man bei den Pigmentbildungen auf Kartoffeln grosse Unterschiede. Derartige Schwierigkeiten sind bei besonders praktisch wichtigen Species, wie den Parasiten von Cholera asiatica, Abdominaltyphus, Wildseuche und Schweinepest, wegen der Differenzialdiagnose sehr zu beachten.

---

[1]) Centralblatt f. Bakteriologie 1889, V, No. 13.

Unter Berücksichtigung dieser gelegentlichen Schwierigkeiten kann man im Allgemeinen einige Gruppen aufstellen. Einzelne Bakterien, wie die des Abdominaltyphus, wachsen über die ganze Kartoffeloberfläche, ohne dass dabei ausser einem feuchten Glanze ein sichtbares Wachsthum zu erkennen ist, ist jedoch die Kartoffel weniger sauer oder gar alkalisch. so tritt die Kultur mit gelblicher bis brauner Farbe auf. Andere wachsen zwar annähernd in der Farbe der Kartoffeln, aber die Zoogloeen markiren sich in glatten oder gefalteten Membranen oder in Form eines schmierigen Belages. Andere wiederum bilden bei ihrem Wachsthum Pigmente, welche sich deutlich von der Farbe der Kartoffeln abheben. Die Form der Zoogloeen auf den Kartoffeln hängt von der Art des Impfens ab. Bei stich- oder punktförmigem Impfen (cfr. Taf. I, Fig. 2, b) bilden sich von dem Punkte als Centrum aus mehr oder weniger kreisförmige Zoogloeen, bei strichförmigem Impfen (a) bilden sich Streifen und wenn man auf der Mitte der Kartoffel grössere Mengen Impfmaterial verrieben hat, so entstehen breite Auflagerungen.

In Flüssigkeiten und gelatinirenden Medien lassen sich alle diese Menkmale vermehren, wenn man Farblösungen zusetzt, welche sich bei Aenderung der Reaction oder durch Oxydation oder Reduction verändern können cfr. S. 255. Mit solchen Zusätzen kann man Veränderungen wahrnehmen, welche ohne dieselbe dem Auge unsichtbar geblieben wären und die erst durch chemische Prüfungen hätten erkannt werden können, oder man kann dieselben schon zu einer Zeit sehen, in der man sonst noch nichts wahrnehmen würde.

Bei dem von Poehl gewählten Zusatze von Ferrichlorid und rothem Blutlaugensalz tritt die Bildung von Berliner Blau nur in saurer Lösung direct auf. Bei alkalischen Medien, wie sie die Bakterien im Allgemeinen erfordern, tritt die Bildung der blauen Farbe erst bei nachträglichem Zusatze von Mineralsäure ein. Hierdurch wurde Poehl l. c. zufällig zur Entdeckung der Reaction des Choleraroth geführt.

Dass der Darminhalt von Choleraleichen mit Salpetersäure eine rothe Färbung giebt, hatte Virchow bereits 1848 mitgetheilt und Griesinger 1866 dasselbe für die Reiswasserstühle angegeben. Bei der oxydirenden Wirkung der Salpetersäure und dem Mangel

einer besonderen Angabe über die Reinheit der Säure ist es aber unsicher, ob es sich wirklich um das ächte Choleraroth gehandelt hat. Die Verwendung von Salzsäure durch Poehl war desshalb sehr wichtig. Bujwid[1]) empfahl diese Reaction zur Differentialdiagnose der Cholera. Dunham[2]) empfahl zu demselben Zwecke Schwefelsäure und beobachtete, dass die Reaction am stärksten ist, wenn die Lösung Pepton enthält und möglichst farblos ist. Zu diesem Zwecke verwendet er Lösungen von 1 % Pepton mit 0,5 % Kochsalz. Brieger[3]) erwies das Choleraroth als ein Indolderivat, Ali-Cohen[4]) erkannte, dass die Reaction nur bei Anwesenheit von salpetriger Säure vor sich geht. Jadassohn[5]) und Zaeslein[6]) ermittelten, dass nur für Kulturen mit Luftzutritt die Mineralsäuren das Choleraroth hervorrufen, was aber nicht durchgreifend richtig ist und nur für den besonderen Nährboden gilt. Schliesslich fand Salkowski[7]), dass die Cholerabakterien sowohl Indol als salpetrige Säure bilden und Indol giebt überhaupt mit concentrirten Mineralsäuren bei Gegenwart von salpetriger Säure diesen Farbstoff.

Nach Salkowski soll die Bildung der salpetrigen Säure aus Ammoniak erfolgen, während Petri[8]) fand, dass es sich um eine Reduction von Nitraten handelt, welche aus dem künstlichen Nährboden stammen. Man darf nicht so lange warten, bis die salpetrige Säure wieder verschwunden ist; die Reaction ist zwischen 24 bis 48 Stunden am sichersten, wenn auch nicht immer am intensivsten, später nimmt sie oft noch etwas zu, um dann aber bis zum gänzlichen Verschwinden wieder abzunehmen. Zur Differentialdiagnose muss man ganz reine Salz- oder Schwefelsäure verwenden, welche

---

[1]) Zeitschrift für Hygiene 1887, II, S. 52.

[2]) ibid. S. 237.

[3]) Deutsche med. Wochenschrift 1887, No. 15, No. 22; Berliner klinische Wochenschrift 1887, No. 44.

[4]) Fortschritte der Medicin 1887, Bd. V, No. 17.

[5]) Bresl. ärztliche Zeitschrift 1887, No. 16.

[6]) Deutsche med. Wochenschrift 1887, S. 72.

[7]) Virchow's Archiv 1887, Bd. 110, S. 366.

[8]) Centralblatt für Bakteriologie 1889, V, No. 17; Arbeiten a. d. K. Gesundheitsamte 1890, VI, S. 1.

man zu der am besten vorher filtrirten Kultur am Glase so vorsichtig herunterlaufen lässt, dass keine Vermischung eintritt, sondern dass sich die schwere Mineralsäure unter der Kulturflüssigkeit sammelt. Es entsteht dann an der Berührungsstelle ein deutlicher rosa Ring. Waren die Substrate frei von Nitraten, so tritt die Reaction nur ein, wenn vor der Säure etwas Kaliumnitrit zugefügt war.

Kitasato[1]) fand, dass das Nichteintreten der Indolreaction bei Zusatz von Säure und Kaliumnitrit die Typhusbacillen gegen die von ihm geprüften typhusähnlichen Bakterien unterscheidet. Man verwendet von einer 0,02 % Lösung von Kaliumnitrit 1 ccm zu 10 ccm Kultur.

Das Conserviren der bis jetzt betrachteten Kulturen erfolgt A. zur Erhaltung des gährfähigen oder infectiösen Materials oder B. zu Sammlungszwecken, welche letzteren bis zur Anlage bakteriologischer Museen gediehen sind. Die eigentliche Conservirung erfolgt leicht bei Anwesenheit von Dauerformen; bei diesen sowohl als bei den empfindlicheren Formen hat man zu beachten, dass Luft- und Licht-Abschluss und Unmöglichkeit des Eintrocknens die Lebensfähigkeit ausserordentlich begünstigen, besonders wenn das Medium schwach alkalisch ist.

Nach Duclaux[2]) saugt man die keimhaltige Lösung in ca. 5 bis 6 ccm lange, etwa 4 mm weite, an beiden Enden ausgezogene Glasröhrchen, welche nach dem Füllen an beiden Enden zugeschmolzen werden. Soyka und Král[3]) erhalten gleichzeitig auf längere Zeit das Aussehen der Kulturen auf festem Nährboden, indem sie a. Kulturen in flachen Schälchen mit aufgeschliffenem Glasdeckel anlegen, bei denen nach Erreichtsein des gewünschten Stadiums der Deckel mit Paraffin luftdicht abgeschlossen wird; b. indem sie an flachen, runden Schälchen nach eingetretenem Wachsthum den Hals abschmelzen; c. an Reagirgläser wird unten ein Fuss zum Stellen angeschmolzen und das Reagirglas oben abgeschmolzen. In diesen

---

[1]) Zeitschrift für Hygiene 1889, VII, S. 515.

[2]) Annales de chimie et de physique 1885, 6. ser., V; Annales de l'Institut Pasteur 1889, III, S. 78.

[3]) Zeitschrift für Hygiene 1888, IV, S. 143; 1889, V, S. 497.

Fällen wird also wesentlich das Eintrocknen verhindert und dadurch das gute Aussehen der Kultur längere Zeit erhalten, während der für Erhaltung der Virulenz wichtigere Luftabschluss mehr nebenbei und nicht ganz vollkommen erreicht wird.

Da gerade diese Kulturen sich wegen ihrer Schönheit zu Museen eignen und sie viel Platz beanspruchen, so wird der Abschluss des Lichtes nicht genügend beachtet. Czaplewski[1]) stösst den Watteverschluss einige Millimeter in das Reagirglas (und zwar ehe die Bakterienentwicklung ihr Höhenstadium erreicht hat) und giesst nunmehr geschmolzenes Paraffin auf, welches den Wattepfropf durchtränkt und den Raum über der Watte ausfüllt. Für manche Fälle genügt das einfache Zuschmelzen der Reagirgläser, oder nach Plaut[2]) ein Ueberschichten der Kulturen mit sterilisirtem Oel.

Vor Allem ist daran zu denken, dass hohe Temperaturen, Trockenheit, Luftzutritt und Licht, besonders directes Sonnenlicht, die keimtödtenden Agentien sind, welche unsere Kulturen in ihrer Entwicklungsfähigkeit und Virulenz bedrohen.

---

4. Die Kulturmethoden im Allgemeinen; Massenkulturen.

Das Ziel jeder Kulturmethode ist, einen bestimmten Organismus frei von allen Beimischungen, ganz isolirt zu erhalten. In der Natur finden wir aber in Flüssigkeiten immer verschiedene Formen und Arten neben einander, so dass es fast aussichtslos erscheint, in einem solchen Durcheinander heterogener Dinge zu einer Sonderung zu kommen. Die ersten Versuche, wie sie besonders von Pasteur und Cohn unternommen worden waren, lehrten einen biologischen Ausgangspunkt ermitteln, dessen Bedeutung auch jetzt noch unumschränkt anerkannt werden muss. Man beobachtete, dass sich in mikroorganismenhaltigen Flüssigkeiten ein Kampf um's Dasein unter den vielen

[1]) Centralblatt für Bakteriologie 1889, VI, No. 15.

[2]) ibid. 1889, V, No. 9.

Arten abspielte, so dass bald die einen, bald die anderen vorherrschten. Man sah dies daran, dass sich bald nur einfache Trübungen bildeten, bald im Innern oder am Boden besondere Formen von Zoogloeen einstellten oder Decken verschiedener Form auftraten, und fast in jedem solchen Falle erwies sich die dem Auge auffallende einheitliche Form der Zoogloeen auch mikroskopisch einheitlich zusammengesetzt. Zuerst hat wohl Pasteur die Bedeutung dieses Kampfes um's Dasein biologisch richtig erkannt, als er fand, dass sich in Faulflüssigkeiten bisweilen zunächst eine nicht stinkende Zersetzung einstellte. Erst wenn durch Deckenbildung an der Oberfläche die Luft von den tieferen Theilen abgehalten war, trat stinkende Fäulniss auf und mit derselben stellten sich ganz andere Formen in der Flüssigkeit ein, als vorher darin bemerkt worden waren. Die verschiedenen Arten bekämpften sich in diesem Falle, während in anderen Fällen mehrere Arten friedlich nebeneinander leben.

Man kann deshalb die Beziehungen der verschiedenen Mikroorganismen schwer gliedern. Wenn verschiedene Arten nebeneinander gleichzeitig auf oder in demselben Substrate sich an der Zersetzung desselben betheiligen, so haben wir den Zustand der Symbiose. Doch diese Zerlegung des Substrates ändert auch dessen chemische Beschaffenheit und es bietet den anfänglich vorhandenen Arten nicht mehr dieselben günstigen Bedingungen. Dieselben treten zurück und an ihre Stelle treten andere Arten, welche die Zerlegung weiter führen. Diese Succession bezeichnet man mit Garré auch als Metabiose. Verhalten sich endlich Organismen derart, dass die einen die Existenz der anderen unmöglich machen, so ist dies Antagonismus. Derselbe kann wieder einseitig oder gegenseitig sein.

Die Begriffe Symbiose, Metabiose und Antagonismus beziehen sich zunächst immer nur auf die gegenseitigen Beziehungen von je zwei Arten und deshalb können dieselben nicht dazu dienen, schroffe allgemeine Schranken für die Arten aufzustellen. Sind diese biologischen Begriffe zunächst auch bei saprophytischen Bakterien gewonnen, so können wir sie doch jetzt auch auf die pathogenen übertragen. Wir kennen Krankheiten, mit denen sich andere sehr häufig als Mischinfectionen zusammen einstellen. Auf andere Krankheiten folgen mit Vorliebe gewisse Nachkrankheiten. Das Ueberstehen einer

Krankheit in der ursprünglichen Form oder als Schutzimpfung verändert den Organismus so, dass dieselbe Krankheit nicht wieder eintritt, aber es kommt auch vor, dass das Ueberstehen einer Krankheit den Organismus nicht nur gegen diese, sondern auch gegen andere Krankheiten unempfänglich macht. Bei dieser Abhängigkeit, in der sich die Mikroorganismen je nach den Species von dem todten oder lebenden Substrate befinden, muss bei dem Hineingelangen von Organismen auf oder in ein Substrat, je nach den Beziehungen von Symbiose, Metabiose oder Antagonismus, in der Regel ein- oder selbst mehreremal im Verlaufe der Zersetzungen die eine oder andere Art relativ oder ganz rein sein, weil sie allein herrscht.

Ueberträgt man nun von einem derartigen in Folge des Kampfes um das Nährmaterial relativ reinen Material eine „Spur" oder einen „Tropfen" auf eine beliebige sterilisirte Nährlösung, so wird bei zufällig ganz reinem Ausgangsmaterial eine wirkliche Reinkultur resultiren, vorausgesetzt, dass die Nährlösung zur Ernährung der Art geeignet ist.

Ueberträgt man nach eingetretenem Wachsthum in derselben Weise von dem ersten in ein zweites und darauf in ein drittes Glas etc., so wird man oft das reine Ausgangsmaterial auch durch mehrere „Umzüchtungen", die man früher auch als „Generationen" bezeichnete, rein erhalten können. In der Regel wird bei dieser Art der Uebertragung einmal eine zufällige, unbeabsichtigte Nebeninfection z. B. aus der Luft stattfinden können und dann hängt es ganz von den Nebenumständen ab, ob die ursprüngliche Art rein bleibt und den Eindringling unterdrückt, oder ob umgekehrt dieser allmählich die anfangs vorherrschende Art überwindet. War das Ausgangsmaterial nur relativ rein, so wird nicht nothwendigerweise diejenige Art rein werden, welche Anfangs in Mehrzahl war, sondern diejenige, der die Existenzbedingungen am meisten zusagen, d. h. es beginnt von Neuem ein Kampf um das Nährmaterial.

Schliesslich erhält man als Folge derartiger Uebertragungen einmal eine reine Kultur von einer Art. Ob dies aber die von Anfang an gewünschte war, das hat man nicht in der Hand, wenn man keine Rücksicht auf das Ausgangsmaterial nimmt und mit beliebigen Nährlösungen arbeitet. In Folge des eine Zeit lang

sehr beliebten Arbeitens mit Normalsalzlösungen ergab sich, dass man bestimmte Species fast immer wieder bekam, mochte das ursprüngliche Material herstammen, woher es wollte. Früher kamen so bakterium termo und bacillus subtilis in Mode und jetzt scheint die Reihe an den Kartoffelbacillen zu sein, seit andere Lösungen allgemeiner verwendet werden.

Die Reinheit derartiger Kulturen ist aber gross genug, um mit diesem Material morphologische Studien über die einzelnen Arten zu machen, und deshalb konnte besonders Cohn seit 1870 mit dieser unvollständigen Trennungsmethode relativ viel erreichen. Jetzt wissen wir allerdings, dass diese Cohn'schen Species vielfach Collectivspecies sind, dass unter den gewählten Bedingungen ähnliche, aber nicht identische Arten oft gleich gut fortkommen, aber die allgemein morphologischen Ermittelungen, deren erste Klärung Cohn zu verdanken ist, haben unter dieser Unsicherheit nur wenig gelitten und damit hat diese Methode sich einen wichtigen Platz in der Geschichte erworben.

Ganz in derselben Form der Uebertragung einer Spur oder eines Tropfens des Ausgangsmaterials in eine Nährlösung verfuhr Pasteur[1]) bei der ersten Arbeit, mit der er in den Kampf für die vitalistische Gährungstheorie eintrat. Aber Pasteur übertrug diese Spur der in der ursprünglichen Flüssigkeit enthaltenen „Hefe" nicht in irgend eine beliebige Flüssigkeit, sondern in eine der ursprünglichen gleichartige. Es sind also zwei wichtige Momente zu beachten, welche später fast immer verwerthet wurden, auch da, wo die Autoren sich im Gegensatze zu Pasteur zu befinden glaubten. Pasteur entnahm eine Spur Ausgangsmaterial, als sich dieses im Zustande der vollsten Gährwirkung befand. In diesem Zustande ist aber in Folge der Gährwirkung ein bestimmter Organismus so vorherrschend, dass er alle etwaigen Mitbewerber um das Nährmaterial zeitweilig ganz unterdrückt. Pasteur hat demnach der Entnahme eines in Folge einer specifischen Thätigkeit relativ oder ganz reinen und vorher bestimmten, specifischen Ausgangsmaterials eine besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Dann hat er aber auch dieses

[1]) Comptes rendus 1857, Bd. 45, S. 913.

specifische und reine Material auf einen adäquaten Nährboden übertragen, auf dem es seine specifische Thätigkeit von Neuem ausüben konnte. Die Folge hiervon musste, da Pasteur auch die übrigen Nebenbedingungen, wie Temperatur, Luftzutritt oder Luftabschluss zuerst würdigte, die sein, dass sich das etwa noch nicht ganz reine Material durch die Gährwirkung selbst noch weiter reinigte, so dass Pasteur, den die morphologische Seite der Forschung nie bekümmert hat und der sich über dieselbe immer hinwegsetzte, von Anfang an relativ und meist wirklich reine, zu biologischen Untersuchungen geeignete Kulturen hatte und dieselben bis zum Schlusse rein erhielt, wie es Duclaux[1]) 1889 an alten Kulturen Pasteurs aus den Jahren 1873 und 74 noch nachträglich mit Zuhülfenahme der modernsten Methoden nachwies. Die Möglichkeit war auch von Grotenfelt[2]) in meinem Laboratorium direct nachgewiesen worden.

Wir haben also in der ersten Periode relativ reine und selbst wirklich reine Massenkulturen zu gewinnen gelernt, welche für die saprophytischen Bakterien das Material nach der morphologischen und biologischen Seite vorzubereiten erlaubten. Diese vorbereitenden, relativ reinen Massenkulturen haben auch jetzt noch nichts an ihrer Bedeutung verloren und sie waren unbewusst oft der Grund zum Gelingen von Reinkulturen mit anderen Methoden.

Für Krankheitserreger brachte Klebs[3]) diese Uebertragungen in Form der fractionirten Kulturen, indem er die Spur oder den Bakterientropfen anderer Autoren als fractio bezeichnet. Klebs verfuhr in der Art (l. c. S. 46), „dass er frisch ausgezogene und fein zugespitzte Capillarröhren auf den Boden der pilzhaltigen Flüssigkeit einsenkte und dort die Spitze abbrach; das herausgezogene Röhrchen wurde wieder zugeschmolzen, mit starkem Alkohol gereinigt und in einer pilzfreien Vegetationsflüssigkeit, die sich unter einer Oelschicht in einer Stöpselflasche befand, wiederum zerbrochen."

---

[1]) Annales de l'Institut Pasteur 1889, III, S. 375.

[2]) Fortschritte der Medicin, 1889 No. 4.

[3]) Archiv für experimentelle Pathologie 1873, Bd. I, S. 31.

Diese Prozedur wurde öfters wiederholt und „in dieser Weise ist es möglich (l. c. S. 47) etwaige Verunreinigungen, die in der Ursprungsflüssigkeit enthalten sein mögen, zu entfernen und denjenigen Körper rein zu erhalten, welcher in der ersteren in überwiegender Menge vorhanden war."

Trotz dieses subtileren Arbeitens und der schärferen Betonung des Ausganges von einem an Anzahl überwiegenden Organismus hat diese Methode keine Fortschritte gebracht. Auch bei dieser Complication der Pasteur'schen Methode stellte es sich leider evident heraus, dass in der Regel nicht der gewollte pathogene Organismus nach einer Reihe von Fractionen rein vorhanden war, sondern, dass meist irgend eine, zu Anfang wegen der geringen Zahl vielleicht ganz übersehene oder durch Luftinfection oder Manipulationen eingebrachte Art von gewöhnlichen saprophytischen Bakterien rein gewonnen wurde, welche unter den gewählten Bedingungen besser fortkam, als die empfindlicheren pathogenen Bakterien. Die pathogenen wurden von den saprophytischen meist sogar schnell überwuchert, weil das gewählte Nährmaterial ohne jede Rücksicht auf die Bedürfnisse der pathogenen Arten genommen wurde. Die fractionirten Kulturen mussten also, ähnlich wie die Cohn'schen Uebertragungen, zwar endlich einmal zu einer reinen Kultur führen, aber diese war in der Regel, im Gegensatze zu den Gährungsversuchen von Pasteur, nicht der gewollte specifische Organismus, sondern ein beliebiger. Bei den pathogenen Arten muss die Entnahme des Ausgangsmaterials noch viel sorgfältiger geschehen, da die Möglichkeit weiterer Reinigung durch Ausübung specifischer Thätigkeit mit dem Momente der Entfernung aus dem Thierkörper abgeschnitten scheint, so dass alle sekundären Störungen doppelt nachtheilig einwirken. Die Regel muss sogar sein, dass selbst ein reines Ausgangsmaterial von der zweiten Uebertragung ab unrein wird.

Diese Massenkulturen nach Pasteur, Cohn, Klebs sind in erster Linie zur Trennung einer bestimmten Art von anderen Arten geeignet.

Für diesen Zweck kann man, wie sich aus dem Mitgetheilten ergiebt, ein ursprünglich unreines Material vortheilhaft vorbereiten,

wie es auch fast ausnahmslos von den Forschern geschehen ist, welche sich dieser Methode mit Erfolg bedient haben, unter Zuhülfenahme sekundärer Momente, welche sich nach Brefeld's[1]) Zusammenfassung „aus der abweichenden Lebensweise und aus anderen morphologischen und physiologischen Eigenthümlichkeiten der verschiedenen Formen herleiten lassen." Mit dieser Vorbereitung gelingt selbst mit den älteren Massenkulturen bisweilen eine Isolirung von einzelnen pathogenen Organismen, noch mehr von Fermentbakterien, deren Existensbedingungen man schon annähernd kennt oder aus der Art ihres spontanen Vorkommens vermuthet. Das durch die Reinkulturen erst zu beweisende, die Biologie der Mikrobien, wird in diesen Fällen demnach provisorisch als schon bekannt vorausgesetzt. Auch von Koch[2]) wurde gleichzeitig mit Brefeld diese Nothwendigkeit hervorgehoben, die biologischen Differenzen der Arten bei der Auswahl der Nährmedien zu berücksichtigen.

Man wählt Nährflüssigkeiten, von welchen man bestimmt weiss oder vermuthet, dass sie die supponirte Gährung eingehen können, impft dieselben mit einer Spur oder einem Tropfen des noch unreinen Ausgangsmaterials, bringt diese so geimpften Kölbchen bei Luftzutritt in höhere oder niedere Temperatur, überträgt nach eingetretener Entwicklung ein zweites Mal, bis man eine leidliche Reinkultur eines Organismus hat.

Andere solcher Kölbchen hält man unter Luftabschluss, wenn man vermuthet, dass die betreffende Fermentation besser bei Beschränkung oder Abschluss von Luftsauerstoff vor sich geht[3]), wie bei den Experimenten über Anaërobiose noch genauer dargelegt wird. Nach einigen derartigen Uebertragungen hat ein Organismus und zwar bei richtiger Wahl der Bedingungen im Gegensatze zu der ursprünglichen Ausführungsweise der fractionirten Kulturen und ähn-

---

[1]) Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze 1881, Bd. 4, S. 12.

[2]) Mittheilungen a. d. K. Gesundheitsamt 1881. Bd. I.

[3]) Fitz: Ueber Spaltpilzgährungen. IX. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 1884, Bd. XVII, S. 1188.

wie bei Pasteu's Ausführung ein bestimmter Organismus das Uebergewicht erhalten, so dass andere Organismen an Zahl erheblich zurücktreten.

Unter diesen Massenkulturen bedarf

die Erhitzungsmethode

noch einer kurzen Erläuterung. Roberts[1]) hat auf dieselbe eine Isolirungsmethode der sogen. Heubacillen gegründet, indem er das Heuinfus eine Stunde lang kochte.

In allen Fällen, in denen nach kürzerem oder längerem Einwirken der Siedehitze oder einer dieselbe noch übersteigenden Temperatur in Flüssigkeiten später Bakterienvegetation eintrat, ermittelte Cohn[2]) zuerst den morphologischen Grund darin, dass es sich immer um endogene Sporen bildende Bakterien handelte, deren Sporen auf kürzere oder längere Zeit den hohen Temperaturen widerstanden. Miquel[3]) isolirte einen Ammoniak bildenden „bacillus ureae" aus Abwässern, in denen seine Sporen vorhanden waren, dadurch, dass er Gläser mit diesem sporenhaltigen Wasser auf 108° erhitzte; van Tieghem[4]) gewann den bacillus amylobacter (clostridium butyricum) durch Erhitzen seiner Sporen auf 100° rein. Brefeld[5]) fand, dass zur Vernichtung der Sporen des bacillus subtilis nöthig waren: dreistündiges Kochen bei Siedetemperatur, oder eine Wärme des Oelbades von 105° $^1/_4$ Stunde, von 107° 10 Minuten, von 110° 5 Minuten. Nach M. Gruber[6]) wurden die Sporen von b. subtilis in Flüssigkeiten durch $2^1/_2$stündige Einwirkung von strömendem Dampfe nicht getödtet und Globig[7]) fand, dass die Sporen eines

---

[1]) Philosophical Transactions of the R. Soc. 1874. Bd. 164.

[2]) Untersuchungen über Bakterien, IV: die Bakterien und die Urzeugung. Beiträge zur Biologie der Pflanzen. II. Bd., Heft 2, 1876, S. 249. Vergl. auch die Litteratur im Abschnitte über Sterilisation und über Sporenfärbung.

[3]) Bulletin de la société chimique de Paris 1879, Bd. XXXII, S. 127.

[4]) Bulletin de la société botanique de France 1879, Bd. 26. S. 25.

[5]) Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze. 1881, Bd. IV, S. 51.

[6]) Centralblatt für Bakteriologie 1888, III, No. 18.

[7]) Zeitschrift für Hygiene 1887, III, S. 322.

rothen Kartoffelbacillus durch strömenden Dampf erst in $5^1/_2$ bis 6 Stunden, durch gespannten Dampf von 110° innerhalb 30 Minuten getödtet wurden. Durch Abkürzung dieser Zeit kann man diese Bacillen rein von allen weniger widerstandsfähigen erhalten. Prazmowski[1]) bediente sich zur Erzielung und Erhaltung von Reinkulturen der sporenbildenden Bacillen und Clostridien des kürzeren oder längeren Aufkochens der sporenhaltigen Flüssigkeiten. Ohne Rücksicht auf diese Ermittelungen hat dann Gunning[2]) vorgeschlagen, die höheren Temperaturen systematisch zur Isolirung der verschiedenen Bakterien zu verwenden. Gunning selbst isolirte dabei allerdings, wie alle vor ihm, eine sporenbildende Art

Bei systematischer Prüfung dieser Methode durch Verwendung von sporenfreien und sporenhaltigen Reinkulturen verschiedener Bakterienarten ermittelte ich bereits 1883, was allerdings für jeden mit der Biologie der Bakterien Vertrauten vorauszusehen war, dass man auch durch systematisches Erhitzen unterhalb, bei und oberhalb der Siedetemperatur immer nur die widerstandsfähigeren von den weniger resistenten trennen kann, derart, dass sich für praktische Zwecke ausschliesslich die Trennung sporenhaltiger Bakterien von sporenfreien empfiehlt. Sind zwei annähernd resistente Sporenarten vorhanden, so ist durch kürzeres oder längeres Erhitzen allein eine genügende Trennung nicht zu erreichen. Das Verfahren, durch Erhitzen leidliche oder ganz reine Massenkulturen zu gewinnen, ist, wie ich schon früher[3]) angab, auf bestimmte Fälle beschränkt, aber für diese auch so gut brauchbar, dass es zur Trennung sporenhaltiger von sporenfreien Bakterien wohl die beste Methode zur Gewinnung von vorbereitenden Massenkulturen, oft selbst von wirklichen Reinkulturen ist.

Wenn Massenkulturen von Bakterien oder anderen Mikroorganismen gewonnen werden sollen, bei denen mehr morphologische als

[1]) Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bakterien-Arten, 1880, S. 8.

[2]) Beiträge zur hygienischen Untersuchung des Wassers. Archiv für Hygiene, 1883, I. Bd. S. 335.

[3]) Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte, 1884, II. Bd., S. 330.

biologische Forschungen in Frage kommen, bei denen es also nur auf relative Reinheit ankommt, so kann man von der alten Erfahrungsthatsache ausgehen, dass auch in einem reinen Wasser ein darin schwimmendes Blatt oder ein Holzstückchen oder sonstiges thierisches oder pflanzliches Gebilde die Bakterien und Infusorien anlockt. Das in die Umgebung diffundirende Nährmaterial bietet Existensbedingungen, wie sie das reine Wasser nicht bietet und man findet an solchen Blättern oft seltene Arten oder Formen, so dass der Morphologe sich auch mit dieser Art der Kulturen etwas bekannt machen muss.

Zopf[1]) empfiehlt Pollenkörner von Coniferen auf Wasser aufzusäen. An diesen Körnern sammeln sich die Keime von Saprolegnien, Chytridiaceen, Myzetozoen, Monadinen etc. und entwickeln sich oft schon innerhalb 15 bis 30 Stunden zu sporangientragenden Pflänzchen, welche man mit den Pollenkörnern leicht aus dem unreinen Wasser herausnehmen und damit isoliren kann.

Waddington[2]) suspendirt kleine Stücke eines sehr harten Zwiebacks mit Confervenfäden in das Infusorien enthaltende Wasser. Um den Zwieback bildet sich in einiger Zeit eine reiche Vegetation von Mikroorganismen aus, unter denen besonders einige Arten von Infusorien zu bemerken sind. Hebt man dann das Fadenconvolut aus dem Wasser, so legen sich die Fäden fest zusammen und gestatten so als Fangnetz alles zwischen ihren Maschen Befindliche herauszunehmen. Von der Fadenmasse bringt man etwas auf einen Objectträger, breitet dieselbe mit Nadeln etwas aus und befreit dadurch die gefangenen Infusorien in einem Tropfen Wasser, der sich auf dem Objectträger befindet.

Zum Isoliren von Diatomeen empfiehlt Debes[3]) die mit Diatomeen besetzten Fadenalgen oder anderen Wasserpflanzen ganz mit dem Netz herauszuheben und das Wasser ablaufen zu lassen. Diatomeen-

---

[1]) Abhandl. der naturforschenden Gesellschaft zu Halle, 1887, Bd. 17.

[2]) Journal of the R. Mikroskop. Society 1883, Ser. II. Vol. III, S. 185. Referat von Griesbach in Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie. 1884, Bd. I, S. 283.

[3]) Zeitschrift f. wissenschaftl. Mikroskopie 1886, Bd. III. S. 27.

haltiger Schlamm, besonders auch der Meerschlamm, Schlick, wird in ein Gefäss mit Wasser übertragen, um dieses der Besonnung auszusetzen. Einzelne Arten bilden dann am schlammhaltigen Boden Ueberzüge, welche durch die sich entwickelnden Sauerstoffblasen oft in toto an die Oberfläche getrieben werden.

Bei Beobachtungen eines Bakterientropfens in einer feuchten Kammer hatte Engelmann[1]) bereits früher beobachtet, dass sich manche Arten stets am Rande sammeln, wo der Sauerstoff am reichlichsten zu Gebote steht, während andere gerade umgekehrt die innersten Parthien einnehmen, während wieder andere, darunter besonders auch einige seltenere Schraubenbakterien, eine zwischenliegende Zone bevorzugen, so dass also der Luftsauerstoff als Reiz- oder Abstossungsmittel sondernd, isolirend wirkt. Dann haben Stahl und de Bary und in der letzten Zeit besonders Pfeffer[2]) diese Fähigkeit gewisser Stoffe, bewegliche Bakterien und andere bewegliche Mikroorganismen und Zellen anzulocken oder abzustossen, studirt und mit dem Namen positive oder negative Chemotaxis belegt. Da bei derartigen in Lösung befindlichen Stoffen auch der Nährwerth als Reiz in Betracht kommen kann, so wird in vielen Fällen die allgemeine Chemotaxis zur Trophotaxis. Pfeffer verwendet für kleine Bakterienformen Kapillaren von 0,03—0,06, für grössere Bakterien von 0,05—0,08 und für grössere Organismen von 0,06—0,12 mm Weite. Diese 4 bis 7 mm langen Kapillaren sind an einem Ende zugeschmolzen und werden mit der Lockflüssigkeit durch partielles Evacuiren unter der Luftpumpe derart gefüllt, dass am abgeschmolzenen Ende ein lufthaltiger Raum von 2 bis 4 mm Länge übrig bleibt. Ali Cohen[3]) verwendet Kapillaren von 7 μ Durchmesser und 3 cm Länge, welche beiderseits noch offen in die Flüssigkeit eingetaucht und herausgezogen werden, wenn sie zu ca. $^3/_4$ gefüllt sind. Dann wird das nicht gefüllte Ende durch kurzes Eintauchen in die Gasflamme zugeschmol-

1) Botanische Zeitung 1881.
2) Untersuchungen a. d. bot. Institut in Tübingen 1887, S. 582.
3) Centralblatt für Bakteriologie 1890, VIII, No. 6.

zen. Hierdurch wird die Luft etwas verdünnt und die Flüssigkeit eingezogen, so dass dieselbe nicht mehr vollständig bis an die freie Oeffnung reicht, was aber nothwendig ist. Man schneidet deshalb einfach mit einer Scheere so viel von den Kapillaren ab, bis dies der Fall ist. Als Reizmittel dienen zur Einübung des Verfahrens die gewöhnlichen Nährsalze, besonders Kaliumchlorid, in Concentrationen von 0,001 bis 1 % und bei Cholera- und Typhusbacillen besonders auch der Saft von rohen Kartoffeln. Die Kapillaren werden, unter Beachtung gleicher Temperatur für Kapillare und Bakterienflüssigkeit, mit dem offenen Ende in den auf dem offenen Objectträger befindlichen Tropfen eingeschoben. Je nach der Menge und Beweglichkeit der Bakterien und der Art und Intensität des Reizes sammeln sich die Arten um die Oeffnung und in der Kapillare selbt an, welche letztere sie wie mit einem Pfropf anfüllen können.

Diese Methode eignet sich auch um Infusorien und amöboide Körperzellen, Leukocyten, einzufangen[1]) und deren phogocytäre Thätigkeit direkt zu beobachten. Statt runder Kapillaren ist es in solchen Fällen noch vortheilhafter sich Kapillaren aus Glasröhrchen mit parallelen Wandungen herzustellen, die man besser direct unter das Mikroskop legen kann. In letzter Zeit ist diese Chemotaxis besonders von Gabritschewsky[2]), H. Buchner[3]), Scholl und mir[4]) für pathologische Prozesse studirt worden, um zu erkennen, welche Bakterien, lebend oder todt, und welche Bakterienproteïne oder Stoffwechselproducte derselben oder welche Nährkörper lockend auf die Leukocyten wirken. Für diese Fälle kann man statt der Kapillaren 2—3 cm lange Glasröhrchen von 0,4 cm Weite und starker Wandung nehmen, welche an beiden Enden zugeschmolzen und mit der zu prüfenden Substanz gefüllt in den thierischen Organismus eingeführt werden. Dies geschieht in der Regel so, dass an einer sorgfältig gereinigten und desinficirten

---

1) Metschnikoff: Annales de l'Institut Pasteur 1890, S. 82. Anmerkung.

2) ibid. S. 346.

3) Berliner klin. Wochenschrift 1890 Nr. 47.

4) ibid. 1891 No. 8.

Hautstelle ein Einschnitt gemacht wird, durch den die Röhrchen in das Unterhautgewebe gebracht werden. Von hier aus werden sie an eine passende Stelle vorgeschoben und dann die Wunde geschlossen. Nach Einheilen zerbricht man das eine Ende des Röhrchens subcutan und sieht nach einiger Zeit (von Stunden bis zu Tagen wechseln) nach, ob sich Leukocyten oder ganze Eiterpfröpfchen in den Röhrchen finden. Selbstverständlich muss die Abwesenheit von Mikrobien constatirt werden.

Bei den bis jetzt betrachteten Massenkulturen ist wiederholtes mikroskopisches Prüfen zur Beurtheilung der Reinheit unerlässlich, da das makroskopische Verhalten allein zu unsicher ist. Hieraus resultirt der Wunsch, die Methoden der Isolirung durch Massenkulturen bis zu ganz einwandsfreien Reinkulturen zu verfeinern. Dies ist nach zwei Richtungen denkbar. Einmal kann man versuchen, die Entwicklung einer Art direct von Spore zu Spore zu beobachten, oder man kann zweitens auf Mittel sinnen, um die Keime so zu vertheilen, dass eine bestimmte Volumeneinheit, z. B. ein Tropfen Flüssigkeit, nur einen einzigen Keim enthält. In diesem Falle muss die Uebertragung einer solchen Einheit mit einem Keime, wenn derselbe unter zusagende Bedingungen gebracht wird, eine wirklich ächte Reinkultur liefern,

---

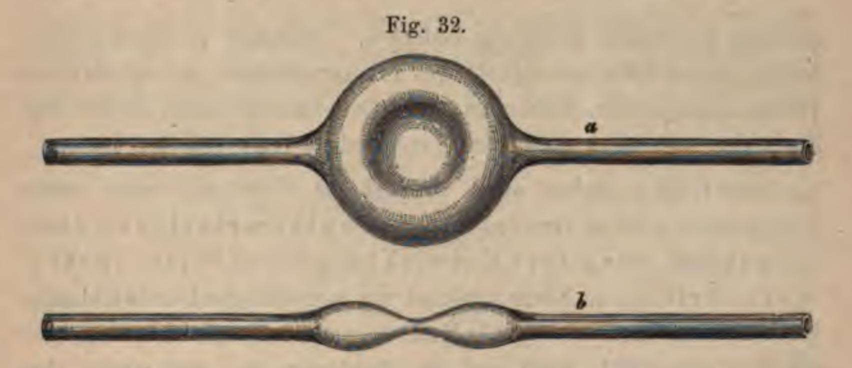
5. Directe Beobachtung der Entwicklung bei Ausgang von einem Keime; die Gelatinekulturen von Klebs und Brefeld.

Als Klebs 1873 l. c. versuchte einen Kokkus unter dem Mikroskope zu fixiren, um seine Theilung direct zu beobachten und so die ganze Reinkultur auf einen einzigen Keim zurückzuführen, gelang ihm dies in Flüssigkeitstropfen nicht, einerseits wegen der Bewegung, welche in dem Tropfen sich einstellte, und dann, weil bei Luftzutritt die Concentration der Flüssigkeit durch Verdunstung sich änderte,

wodurch der Werth der Flüssigkeit als Nährsubstrat alterirt wurde. Um die Verdunstung der Flüssigkeit aufzuheben oder doch zu beschränken und die Bewegungen zu verhindern, wandte Klebs statt der gewöhnlichen Nährlösungen als Kulturboden gekochte Hausenblase an, welche beim Abkühlen erstarrte. Nach de Bary[1]) ist die Gelatine zuerst 1852 von Vittadini bei der Kultur miskroskopischer Pilze verwendet worden.

Um nun weiter einen einzelnen der in der Hausenblase befindlichen Kokken zu fixiren, bediente sich Klebs der v. Recklinghausen-Geissler'schen Kammern. Bei diesen, Fig. 32, führt ein Zu- und Ableitungsrohr zu einem mittleren Raume aus deckglasdickem Glase, dessen Ober- und Unterseite sich in der Mitte fast berühren, so dass hier ein kleiner kapillarer Raum vorhanden ist. Saugt man diese Kammer voll Wasser, Nährflüssigkeit oder verflüssigte Gelatine, so bleibt, wenn man diese Lösungen wieder aus-

Fig. 32.



fliessen lässt, in den mittleren Verengerungen ein kapillarer Tropfen hängen. Enthielten diese Lösungen gleichzeitig Keime und zwar so viel, dass jeder Tropfen ungefähr einen Keim führte, so wird in vielen Fällen auch der hängengebliebene Tropfen einen Keim enthalten, den man mit starken Trockensystemen leidlich fixiren und beobachten kann. Klebs füllte nun bald die ganze Kammer mit Gelatine oder Hausenblase, wodurch der Luftzutritt zu dem centralen Theile verhindert wurde, bald liess er nur den einen Tropfen

[1]) Vorlesungen 1887, 2. Aufl., S. 29.

in der Kammer, sorgte aber dann dafür, dass die Luft durch Baumwolle filtrirt zutrat.

In anderen Fällen wandte Klebs statt der Kammer mit kapillarem Raum, eine solche an, deren Wände parallel verliefen, und bei denen die Seitenröhren sich etwas unterhalb der oberen Wand ansetzten. Diese Kammern, der Beschreibung nach den von mir benutzten ähnlich, b in Fig. 33, füllte er nun (l. c. S. 46) durch Ablaufenlassen der überschüssigen, flüssigen Gelatine derart, „dass eine dünne Schicht die abwärts gekehrte, zur mikroskopischen Unter-

Fig. 33.



suchung bestimmte Wandung bedeckte." Etwaige in dieser Schicht fixirten Keime kann man mit starken Trockensystemen und schwächeren Immersionssystemen fixiren und ihre Entwicklung direct beobachten. Statt der Luft kann man auch verschiedene Gase zutreten lassen.

Brefeld[1]) suchte sich, zunächt für Pilze, ein ganz reines Ausgangsmaterial zu verschaffen, um, von einem einzigen Keime ausgehend, die ganze Entwicklung eines Pilzes lückenlos zu verfolgen. Diese zunächst nur morphologisch-entwicklungsgeschichtliche Ziele verfolgende Methode wandte Brefeld später, ausführlich erst 1881, auch auf die Bakterien an, und erwies ihre Brauchbarkeit durch die Entwicklungsgeschichte des bacillus subtilis. „Durch Mischen der Keime mit Wasser (l. c. c 1881, S. 12) bis zu einem Grade, dass in einer bestimmten Menge meist kein einziger, oder auch nur ein einziger Keim vorhanden ist, lässt sich die Trennung in einzelne Keime bis zu den kleinsten Formen ohne eine directe

[1]) a. Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze, Bd. I, 1872, S. 10.
b. Methoden zur Untersuchung der Pilze. Verhandl. der physik. med. Gesellschaft in Würzburg. N. F. VIII. Bd. 1874/75, S. 43.
c. Kulturmethoden zur Untersuchung der Pilze. Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze. Bd. IV. 1881, S. 1.

Beobachtung empirisch durchführen.“ „Es setzt diese Methode der Trennung eine vollkommen gleichmässige Vertheilung der einzelnen Keime in der Flüssigkeit voraus. Diese ist nicht immer leicht zu erreichen, und so können sich, wenn man nicht sehr vorsichtig und kritisch zu Werke geht, leicht mehrere und damit fremde Keime in die Kulturen einschleichen. Brefeld verdünnte die Sporen oder Keime enthaltende Flüssigkeit empirisch mit Wasser oder Nährflüssigkeit (l. c. b S. 49), „bis ein mit einer spitzen Nadel herausgenommenes und auf den Objectträger übertragenes Tröpfchen, mit dem Mikroskope besehen, nur eine oder zwei Sporen aufweist.“ „Der Objectträger mit der einen auf ihn übertragenen Spore dient als Unterlage für die Kultur, die hiernach das Prädicat Objectträgerkultur zur Unterscheidung von anderen Kulturformen bekommen hat.“

Wenn man nun zu dieser einen Spore einen Tropfen Nährflüssigkeit zusetzte, so wurde die lückenlose Entwicklung durch zwei Momente erschwert, indem einmal der Kulturtropfen verdunstete und durch diese Aenderung der Concentration in seinem Werthe als Nährflüssigkeit herabgesetzt wurde, und indem andererseits fremde Keime eindringen konnten. Es galt demnach, die Verdunstung des Kulturtropfens zu verhindern und die Kultur für die Dauer der Beobachtung nach Aussen abzuschliessen, „Es ist dies (l. c. b S. 52) in zweifacher Weise möglich, einmal durch Veränderung der Kulturlösung, das anderemal durch Anwendung besonderer Objectträger.“

„Um die Verdunstung zu verhindern (l. c. c S. 15), kann man die Nährlösungen mit Carragheen oder Gelatine in der Art versetzen, dass sie, bei 30 bis 35° noch flüssig, bis 15 Grad abgekühlt, fest werden. In diesen gelatinirten Lösungen wachsen die Pilze wie in dünner Flüssigkeit, ihre Entwicklung ist eher begünstigt, als geschädigt. Man kann die Kultur ohne Gefahr umdrehen, um zu verhindern, dass fremde Keime einfallen; und wenn man sie auf Deckgläsern ausführt, kann man sie umgekehrt auch mit starken Vergrösserungen besehen.“ Diese umgekehrten Objectträger bringt man in eine feuchte Glocke, Fig. 26, S. 270, auf ein Gestell aus Glas oder Zinkblech.

„Will man die gelatinirten Nährlösungen vermeiden (l. c. c S. 15), dann muss man zu besonderen Objectträgern seine Zuflucht nehmen, in welchen die Verdunstung der Nährlösungen und die Invasion fremder Keime unmöglich ist, ohne dass dadurch die Möglichkeit einer continuirlichen Beobachtung im mindesten beeinträchtigt wird."

Brefeld wählte um einen Keim zu fixiren erst, wie Klebs, die von Recklinghausen-Geissler'schen Kammern, Fig. 32. Aber (l. c. c 1881, S. 17) „der kapillare Tropfen ist nach seiner Ansicht für die kleineren Formen zu tief, die Masse der Flüssigkeit zu gross, daher kommen die Bewegungen bei den geringsten Einflüssen, die gar nicht zu vermeiden sind, während man beobachtet, die aber schon ausreichen, eine Verschiebung des eingestellten Keims zu veranlassen. Die Keime müssen fixirt werden, indem man die Menge der umgebenden Nährlösungen so reducirt, dass die Bewegungen minimale werden, dass aber die Menge der umgebenden Nährlösung doch ausreicht für den Keim, um seine volle Entwicklung zurückzulegen. Dies erreicht man nur in dünnen Flüssigkeitsüberzügen. Um sie auf der Innenwand der Kammer herzustellen, so dass die stärksten Linsen heranreichen, muss man andere kleine Kammern anwenden, die keinen kapillaren Raum haben, die von dem dünnsten Glase in Deckglasdicke gemacht, so flach auf beiden Seiten sind, dass innen ein gleichmässiger Ueberzug entsteht, und dass auf der glatten, gleichmässig dicken Fläche die Fixirung eines Keimes mit starken Trockensystemen tagelang ohne Störung möglich wird. Es ist rathsam, den Kammerraum nicht grösser zu machen, als es nach der technischen Herstellung der Kammer eben nöthig ist. Man saugt die reinen Kammern voll, lässt ausfliessen und stellt die einzelnen auf den Innenwänden in dem dünnen Ueberzuge von Nährlösung haften gebliebenen Keime ein. Die Menge der Keime, die man den Nährlösungen zumischt, kann hier weit zahlreicher sein; es bedarf keiner vorherigen Probe ihre Menge zu bestimmen, ebensowenig bedarf es langen Suchens, sie auf den Wänden zu finden. Es gelang mir so, ohne alle Mühe, die Keime von bacillus und von anderen Bakterien für unbegrenzte Zeit zu beobachten und hier geschlossene Entwicklungsreihen herzustellen, wie bei grösseren

Pilzen. Dabei ist es auf das leichteste möglich, die Zeitdauer zu ermitteln, welche für die Wachsthums- und Theilungsvorgänge und schliesslich für den Kreislauf der Entwicklung von Spore zu Spore nöthig ist.

Die Anwendbarkeit dieser Kammern für die Untersuchung der Spaltpilze reicht bis zu den kleinsten Formen hinab, die überhaupt noch mit den stärksten Trockensystemen der Beobachtung zugänglich sind."

Brefeld bediente sich Kammern der Form a, Fig. 33, welche Geissler herstellt. Ich bediene mich der Form b, gleichfalls von Geissler hergestellt. Nach meinen Versuchen gelingt es in der That derartig dünne Ueberzüge von Flüssigkeit herzustellen, wenn die Kammern durch Mineralsäure, Alkohol, Aether, Hitze auf's Sorgfältigste gereinigt und sterilisirt sind. Mit grossem Vortheil kann man, wie Klebs schon 1873 mit ähnlichen Kammern es machte, eine dünne Gelatineschicht herstellen. Ich habe in solchen Gelatineschichten die Bildung von Kolonien, welche mit blossem Auge sichtbar wurden, für einzelne Formen von einem Keime aus verfolgt und in Ueberzügen von Bouillon, Agar und Gelatine die Bildung und Auskeimung der Arthrosporen der Kommabacillen ermittelt. Bei der von mir gewählten Form konnte ich homogene Immersion $^1/_{12}$ mit schwachem Ocular verwenden. Bei allen diesen Kammern bedarf man in der Regel eines der gebräuchlichsten heizbaren Objecttische.

Zur Beobachtung im hängenden Tropfen dienen die in Fig. 3 und 4 S. 48 abgebildeten Objectträger. Das Deckgläschen wird durch concentrirte Mineralsäure, Alkohol und Aether gründlich gereinigt, kurz vor dem Gebrauch durch die Flamme gezogen und gegen Staub geschützt, abgekühlt. Dann bringt man einen kleinen flachen Tropfen sterilisirter Nährlösung mit geglühter Platinöse auf die Mitte des Deckglases, impft diesen Tropfen, indem man mit der Platinnadel das vorsichtig, z. B. aus dem Herzen, entnommene Blut am Rande des Tropfens spurenweise einträgt, dreht das Deckglas um, legt es über den hohlen Objectträger und zieht zur Vermeidung der Verdunstung einen Rand von Vaseline um das Deckglas. In dieser Weise hat Koch bereits bei seinen ersten Untersuchungen über

Milzbrand reine, fortlaufend mikroskopisch controllirte Reinkulturen gewonnen, welche von dem ersten Deckglase dann auf ein zweites in derselben Weise übertragen und weitergezüchtet werden konnten.

Statt den Tropfen am Deckglase zu impfen, kann man auch eine sterilisirte Nährlösung in einem Reagirglase mit der Reinkultur impfen und zwar in dem Grade, dass nach gründlichem Vermischen durch Schütteln eine gleich grosse Probe, als Deckglastrocken-Präparat geprüft, ein bis zwei Keime ergiebt. Man entnimmt dann hiervon einen Tropfen, den man in derselben Weise am Dekglase befestigt. Brefeld (l. c. c S. 16) verwirft diese Methode: „Der Kulturtropfen kann nur klein genommen werden, sonst läuft er zum Tropfen zusammen, er schwankt bei der geringsten Bewegung, die Keimspore verändert ihre Lage und ist mit starken Vergrösserungen kaum zugänglich; kurz, die Beobachtung ist mühsam und unvollkommen, auch dann, wenn man gelatinirte Nährlösungen anwendet."

Mit den oben geschilderten Vorsichtsmaassregeln lässt sich jedoch nach vielen hierauf gerichteten Beobachtungen der hängende Tropfen mit grossem Erfolge verwenden, selbst für die kleinsten Formen der Kokken, sowohl als Flüssigkeitstropfen wie als gelatinirter Tropfen, um zu sehen, ob eine Bakterienkolonie, welche sich einheitlich bei schwachen Vergrösserungen repräsentirt, aus einem einzigen Keime hervorgehen kann. Dieses Faktum ist für Hefekolonien von Hansen[1]) ebenfalls ermittelt durch Verwendung gelatinirter, hängender Tropfen, welche gegen Verdunstung geschützt waren. Hansen vertheilte einige Hefenzellen in verflüssigte Gelatine, bereitete von dieser Mischung eine dünne Schicht am Deckglase aus, brachte dieses mit der Gelatineschicht nach unten über eine feuchte Kammer der Form Fig. 4, S. 49. Sobald die Gelatine erstarrt ist, durchmustert man das Präparat und merkt sich die Lage der einen oder anderen Zelle und sieht von Zeit zu Zeit nach, da in Folge des Gelatinirens die Keime ihre Lage nicht verändern können, also an dem Orte aussprossen müssen. Eine Möglichkeit, diesen bei einiger Uebung so bequem zu handhabenden, auch den

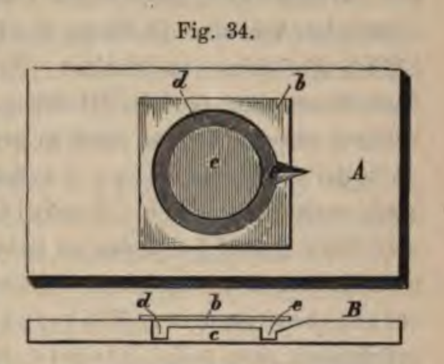
---

[1]) Ueber das Zählen mikroskopischer Gegenstände in der Botanik. Zeitschrift f. wissenschaftl. Mikroskopie 1884, Bd. I, S. 191.

Systemen für homogene Immersion zugänglichen Tropfen für das Studium der einzelnen Phasen der Entwicklung der Bakterien von Spore zu Spore besser als früher zu benutzen, dürfte darin gegeben sein, dass man Parallelversuche mit der Sporenfärbung macht, welche die einzelnen Phasen zu fixiren gestattet, so dass Bienstock[1]) die Sporenfärbung geradezu statt der directen Beobachtung anwandte, was mir allerdings durchaus ungenügend zu sein scheint.

Prazmowski[2]) bediente sich, um Luftzutritt zu gestatten und damit dem Einwande zu begegnen, dass bei der gewöhnlichen Form der hängenden Tropfen nicht genügend Luft vorhanden sei, der modificirten Ranvier'schen Objectträger, Fig. 34. Diese $2^1/_2$ mm dicken Objectträger tragen eine ringförmige Vertiefung d, e; die von diesem Ringe eingeschlossene Kreisfläche c ist sorgfältig glatt geschliffen und ihr Niveau liegt etwas tiefer (für Bakterien höchstens 0,5 mm) als die Fläche des Objectträgers, so dass nach Auflegen des Deckglases b zwischen c und b eine dünne Flüssigkeitsschicht Platz hat; ist der Abstand grösser, so kann man nur hängende Tropfen machen. Die ringförmige Vertiefung, welche zur Aufnahme von etwas Wasser dient, verläuft bei e in eine kleine Rinne. Man bringt dann auf die Kreisfläche c einen Tropfen der sterilisirten Lösung, welche geeimpft wird, oder einen eine annähernd bestimmte Zahl von Bakterien oder Sporen enthaltenden Tropfen, legt dann das vorher durch die Flamme gezogene Deckglas b auf, umrandet es mit Vaseline oder Wachs, so dass, um zu starke Verdunstung zu verhindern, nur bei der Rinne e Luft eintreten kann, welche von der ganzen Rinne her Zutritt zu der zwischen c und b eingeschlossenen

Fig. 34.



[1]) Zeitschrift für klin. Med. 1884, S. 1.

[2]) Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bakterienarten 1880, S. 10.

Flüssigkeitsschicht findet. Diese letztere ist in ihrer ganzen Tiefe für starke Trockensysteme und schwache Immersionssysteme zugänglich.

---

6. Verdünnungs-Methode; Ein-Zell-Kultur.

Haubner[1]) hatte schon 1852 Verdünnungen systematisch angewendet, um über die Natur des Fermentes der sogenannten blauen Milch Aufschluss zu erhalten. Er verdünnte derartige Milch stark mit Wasser und fand die Mischung, in welcher das Ferment „gleichmässig suspendirt" war, auch in geringen Mengen impfkräftig. Diese Art der willkürlichen Verdünnung ist für Bakterien vielfach noch jetzt üblich. Brefeld hat unbestritten das Verdienst, seit 1872 darauf bestanden zu haben, für Mikroorganismen derartige Verdünnungen systematisch vorzunehmen und zwar derart, dass in einer bestimmten Flüssigkeitseinheit nur ein Keim vorhanden sein soll. Brefeld erwies damals selbst die Ausführbarkeit für Schimmelpilze, Pasteur weniger genau, später Hansen exact für Saccharomycesarten. Die Möglichkeit, auf diesem Wege auch bei den Bakterien Reinkulturen zu gewinnen, wurde 1877 von Nägeli[2]) schroff in Abrede gestellt.

„Spaltpilze gestatten mit Sicherheit keine Reinkultur, theils wegen ihrer ausserordentlichen Kleinheit, theils wegen ihrer allgemeinen Verbreitung im Wasser und in der Luft." Nicht um solche, nach seiner damaligen Mittheilung ganz aussichtslose Versuche zu Reinkulturen zu machen, sondern um die „Vermehrungsfähigkeit der Spaltpilze" nach der Intensität der Veränderung des Substrats zu schätzen, gab damals Nägeli eine Verdünnungsmethode an, indem er eine bestimmte Menge Schizomyceten haltige Flüssigkeit mit be-

---

1) Magazin für die gesammte Thierheilkunde, 1852, Bd. 18, S. 1.
2) Nägeli und Schwendener: Das Mikroskop. 2. Aufl. 1877, S. 644.

stimmten Mengen sterilisirtem Wasser verdünnte. Nach Darlegung einer interessanten Gleichung mit lauter unbekannten Grössen kam Nägeli selbst (l. c. S. 646) zu dem Schlusse: „Die Auflösung dieser Gleichung kann nur durch Probiren geschehen." Dieser Modus der Verdünnung, der einem ganz anderen Zweck diente, kann auf jeden Fall nicht dazu dienen, Nägeli die Priorität zuzuerkennen.

Während die Verdünnung, wenn sie nach Brefeld zur lückenlosen Lösung morphologisch-entwicklungsgeschichtlicher Fragen dient, ein möglichst reines Ausgangsmaterial liefern soll, ohne dass dies aber in allen Fällen wegen der fortlaufenden mikroskopischen Beobachtung absolut nöthig ist, muss die Verdünnung, wenn sie zur Lösung einer experimentellen physiologischen oder pathologischen Frage dient, ein absolut reines Material, eine absolute Reinkultur liefern, weil hierbei vom Momente der Uebertragung an die laufende Controlle durch das Mikroskop in Wegfall kommt.

Der erste, welcher für Bakterien mit positivem Erfolge und zum Zwecke der Gewinnung von Reinkulturen in diesem Sinne die Verdünnung soweit trieb, wie Brefeld für Schimmelpilze, war Lister[1]). Derselbe theilte 1878 mit, dass er sauere Milch so verdünnt habe, dass ein Tropfen einen Keim enthalten sollte. Impfte er nun sterilisirte Milch mit 2 bis 4 Tropfen der Verdünnung, so erhielt er regelmässig Säurung und Gerinnung, weniger sicher, wenn er von einem Tropfen ausging, weil in letzterem Falle wohl nicht jeder Tropfen auch wirklich einen Keim enthalten hatte.

Fitz[2]) bediente sich bei seinen Gährungsversuchen gleichfalls der Verdünnungsmethode, die er allein als die „Ein-Zell-Kultur" gelten lässt: „Um eine Reinkultur eines gährungserregenden Spaltpilzes zu gewinnen, ist es unbedingt nothwendig, von einer einzigen Zelle als Aussaat auszugehen." „Man bestimmt in einer gewöhnlichen, noch unreinen Kultur mit Hülfe einer Zählkammer annähernd die Zahl der Spaltpilzzellen, die in einem Tropfen enthalten sind,

---

[1]) On the lactic fermentation and its bearings on pathology. Transactions of the Pathological Society of London 1878. Bd. XXIX.

[2]) Ueber Spaltpilzgährungen. VII. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft. XV. Bd. 1883, S 867.

und verdünnt dann einen Tropfen so stark mit sterilisirtem, destilirtem Wasser, dass im Durchschnitt auf 5 bis 10 Tropfen der verdünnten, gut gemischten Flüssigkeit eine Spaltpilzzelle kommt. Man sät dann in einer Serie von ca. 50 mit Kulturflüssigkeit beschickten und sterilisirten Kölbchen je einen Tropfen aus und setzt sie alsdann in ein Thermostat von 37°. Von den 50 Kölbchen werden im Laufe der nächsten drei Wochen 5 bis 10 Kölbchen Pilzentwicklung zeigen. In einem jeden dieser Kölbchen wird die Pilzkultur unter sich einheitlich und rein sein, weil sie von einer einzigen Zelle abstammt. Man erhält so die verschiedenen Spaltpilze, die in der ursprünglichen unreinen Kultur enthalten waren, jeden für sich isolirt."

Für pathogene Bakterien, speciell für Milzbrandbacillen, verwandte Buchner[1]) die Verdünnungsmethode schon 1878 und 1880, indem er die Milzpulpa zerrieb und mit sterilisirtem Wasser so stark verdünnte, dass auf ca. 10 cmm eine einzige Bakterie kam. Mit solchen, einen Keim enthaltenden 10 cmm wurden dann die sterilisirten Nährlösungen inficirt.

Auch Nägeli theilte 1882 in demselben Werke, S. 13, einen Versuch mit, den er bereits 1871 ausgeführt hatte, so dass seine schroffe Negation von 1877 über die Unmöglichkeit der Gewinnung von Reinkulturen der Bakterien durch Verdünnung schwer verständlich wird, wenn er sich 1871 schon wirklich über den Werth der Verdünnung klar gewesen sein sollte. Er verdünnte faulen Harn so stark mit Wasser, dass je 2 Tropfen einen Bakterienkeim enthielten; durch Uebertragung je eines Keimes in ein Glas mit sterilisirter Lösung gelang es ihm damals aus dem Harn Kokken und Stäbchen zu trennen.

Aehnlich verfuhr Hansen[2]), indem er für Hefe die Verdünnung so weit trieb, dass erst 2 ccm eine Zelle enthielten.

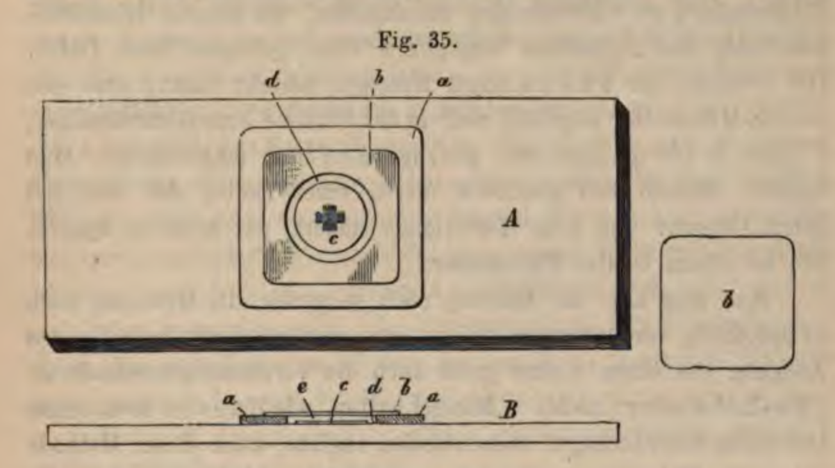
---

[1]) Aerztliches Intelligenzblatt 1878; Sitzungsberichte der bayer. Akademie der Wissenschaften 1880; über die experimentelle Erzeugung des Milzbrandcontagiums aus den Heupilzen. Untersuchungen über niedere Pilze von Nägeli 1882, S. 147.

[2]) Ueber das Zählen mikroskopischer Gegenstände in der Botanik. Zeitschrift f. Wissenschaftl. Mikroskopie. I. Bd. 1884, S. 191.

Zur Zählung der Anzahl der Keime in der ursprünglichen Flüssigkeit sowohl, als in den verdünnten Lösungen, bringt man eine bestimmte Menge in einen Blutkörperchen-Zählapparat. Man kann hierzu die Kammer von Hayem-Nachet wählen. Dieselbe, Fig. 4, S. 49, besteht aus einem Objectträger A, B, auf dem eine mit kreisförmigem Ansschnitt c versehene Glasplatte b von ganz bestimmter Dicke, 0,2 mm, oder für Bakterien noch besser 0,1 mm Dicke, befestigt ist, wie sie Zeiss liefert. Durch Auflegen eines sehr sorgfältig geschliffenen Deckglases d entsteht ein von parallelen

Fig. 35.



Wänden eingeschlossener Raum, von genau 0,2 oder 0,1 mm Höhe, welcher eine ganz bestimmte Menge, eine Volumeneinheit, Flüssigkeit fasst. Die Zählung geschieht dann mit Hilfe eines Ocular-Netzmikrometers. Die Flüssigkeit muss den Raum genau füllen, das Deckglas berühren ohne überzutreten.

Noch feineres Arbeiten gestattet die Modifikation, Fig. 35, welche von Thoma[1]) angegeben ist und von Zeiss ausgeführt wird. Auf einem Objectträger A, B ist eine oben polirte Glasplatte a befestigt, deren kreisförmiger Ausschnitt d die seitliche Kammerwand

[1]) Abbé: Ueber Blutkörper-Zählung. Sitzungsberichte der Jenaischen Gesellsch. f. Med. u. Naturwissenschaft 1878, No. 29. — Lyon und Thoma: Ueber die Methode der Blutkörper-Zählung. Virchow's Archiv 1881. Bd. LXXXIV, S. 131.

bildet. In diesem Ausschnitte ist eine kreisförmige Glasplatte c aufgekittet, welche so stark ist, dass der Raum e zwischen ihr und dem aufgelegten Deckglase b, der eigentliche Zählraum, genau 0,1 mm beträgt; a und c sind sorgfältig parallel zur Oberfläche des Objectträgers geschliffen; ebenso muss die Deckplatte b so sorgfältig planparallel geschliffen und so gereinigt sein, dass sich bei Andrücken derselben an die polirte obere Fläche der Kammer Newton'sche Farbenringe bilden, welche bei Nachlassen des Druckes bestehen bleiben. Die Mischung geschieht mit einem, auch für die ersten Zählkammern zu verwendenden Mischgefäss. Da genaue Gebrauchsanweisung den Apparaten beigegeben wird, genügen diese Daten. Der Vortheil der Thoma'schen Kammer besteht darin, dass das Ocular-Mikrometer wegfällt, weil in der Platte c eine Gittertheilung, 1 qmm in 400 quadratische, gleichgrosse Felder eingeritzt ist. Man braucht deshalb den absoluten Werth eines Theils, der sich bei jedem Objectiv und jeder Tubuslänge ändert, gar nicht zu kennen, wie bei einem Ocular-Mikrometer.

Man mag aber die Zählung noch so genau, die Mischung noch so sorgfältig vorgenommen haben, eine absolute Sicherheit für den Ausgang von einem Keime giebt auch die Verdünnungsmethode als „Ein-Zell-Kultur“ nicht. „Mängel haften, wie Hansen trotz seiner trefflichen Ermittelungen unumwunden zugiebt, auch dieser Methode an; namentlich ist es nicht sicher, ob die Anzahl der Zellen, welche man im Voraus berechnet hat, sich wirklich im Kolben mit der fertigen Infectionsflüssigkeit befinden: es kann sogar vorkommen, dass nicht eine einzige Zelle hineingelangt ist, ferner auch, dass sich mehrere, als man gewünscht hatte, vorfinden.“

Die Verdünnungsmethode kann auch in der besten Form dem theoretischen Postulate des Ausgangs von einem Keime nur bedingt gerecht werden. Jede Verdünnungsmethode, mag sie nun in Flüssigkeiten oder in Lösungen ausgeführt werden, welche bei gewissen Temperaturen erstarren und dadurch aufhören, flüssig zu sein, hat damit zu rechnen, dass auch beim sorgfältigsten Mischen eine vollständige Trennung der einzelnen entwicklungsfähigen Keime bei Bakterien kaum erreichbar ist. Die Sporen der Schimmelpilze sind an sich schon gut iso-

lirt, die Hefezellen sind verhältnissmässig lose verbunden, auch die endogenen Sporen und oft auch die Arthrosporen der Bakterien lösen sich relativ leicht aus einem ursprünglich festeren Verbande; die Arthrosporen sind bisweilen, die vegetativen Zellen und die Ruheformen der Ketten und Fäden meist durch Vergallerten der Membranen in so innigem Zusammenhange, oft geradezu in festen Gallertmassen verbunden, dass eine vollständige Trennung in die Einzelzellen oder noch allgemeiner in die einzelnen entwicklungsfähigen Keime unmöglich werden kann. Derartige, infolge einheitlicher Genese artlich zusammengehörige, verhältnissmässig feste Verbindungen werden dann am wenigsten stören, wenn es sich darum handelt, die Verdünnungsmethode zur Trennung einer bestimmten Art von anderen Arten zu benutzen, weil hierbei die sorgfältige Entnahme des Materials aus gährenden Flüssigkeiten oder aus dem Blute oder Gewebesafte eines kranken Thieres schon von vornherein reine Massenkulturen liefert und es gleichgiltig ist, ob die ganz reinen Kulturen aus einem oder mehreren Keimen derselben Art entstanden sind.

Schon wenn man sich alle diese physiologischen Vorbereitungen durch Massenkulturen zu Nutzen machen kann, muss die Zahl der Einzelversuche bei der Verdünnung eine sehr grosse sein, so dass z. B. Fitz für einen ganz concreten, verhältnissmässig einfachen Fall 50 Einzelversuche verlangt.

Diese Schwierigkeit wächst aber beträchtlich, wenn man sich der Verdünnungsmethode bedienen will, um aus einem Gemische sämmtliche Arten zu isoliren, und sie wird noch weit grösser, wenn man die genaue Zahl der entwicklungsfähigen Einzel-Keime zu bestimmeu versucht, weil dann die vorbereitenden Massenkulturen prinzipiell wegfallen müssen und die mehr oder weniger scharfe Trennung in die Einzelkeime von schwankenden Momenten und Manipulation abhängt, welche wie die Art und Intensität des Schüttelns und Mischens von Fall zu Fall wechseln, wenigstens nie ganz gleichmässig sind.

Je nach dem annähernd abgeschätzten Gehalt der auf die Keimzahl zu prüfenden organismenhaltigen Flüssigkeit muss man die

erste Verdünnung stärker oder schwächer wählen und zwar derart, dass etwa 15 bis 25 % der mit der verdünnten Flüssigkeit zu inficirenden Gläser steril bleiben. Man fügt je nach dem Falle zu 10 —, 100 —, 1000 — etc. ccm sterilisirtem Wasser, welches sich in einem Pasteur'schen Kolben befindet, nach möglichst gleichmässigen Vertheilen und Mischen, einen ccm oder einen Tropfen der bakterienhaltigen Flüssigkeit mit Hülfe einer sterilisirten Pipette, setzt dann den Helm wieder auf und vertheilt nunmehr durch Schütteln die Keime möglichst gleichmässig in dem Wasser, wobei gleichzeitig die festeren Verbände gelockert und die Einzel-Keime möglichst isolirt werden.

Diese verdünnte keimhaltige Flüssigkeit wird dann tropfenweise in etwa 40 v. Freudenreich'sche Kölbchen oder in Reagirgläser, welche sterilisirte Bouillon enthalten, vertheilt. Ist man über den ursprünglichen Keimgehalt ganz im unklaren, so macht Miquel einen orientirenden Vorversuch, welcher 24 Stunden in Anspruch nimmt und hebt die Originalflüssigkeit während dieser 24 Stunden bei 0° auf. Nach 24 Stunden hat sich bei 37° etwa der 4. Theil der Bouillonröhrchen getrübt, in denen überhaupt im Verlaufe des Versuches Entwicklung erfolgt und daraus kann man berechnen, ob die richtige Verdünnung genommen war oder ob der Versuch mit anderen Verdünnungsgraden zu wiederholen ist, da im Ganzen der 4. Theil aller Röhren steril bleiben muss. Die Methode setzt genaues Abmessen und gut graduirte Pipetten voraus, um die Berechnungen ausführen zu können. Selbstverständlich müssen alle Operationen, Oeffnen, Eintragen, Schliessen schnell und am besten im keimfreien Raume vorgenommen werden.

Die Gefahr der Luftinfection ist bei exactem Arbeiten nach Miquel[1]) sehr gering und Entwicklungen, welche durch mehrere Einzelkeime erfolgen, sind sehr selten. Einen gang bestimmten sichtbaren Anhalt, ob die Entwicklung in einem Kölbchen oder Röhrchen auch auf den Ausgang von einem einzigen Keime bezogen werden muss, hat man für Bakterien bis jetzt nicht, da die Einheitlichkeit der entstehenden Zoogloen unmittelbar nur beweist, dass

---

1) Annuaire de l'observatoire de Monsouris 1879—1888.

eine einzige Art sich entwickelt hat. Ob dies aber deshalb geschehen ist, weil nur ein Keim dieser Art vorhanden war, oder ob es geschehen ist, weil diese Art über einen oder wenige mithineingekommene Mitbewerbe den Sieg davon trug, lässt sich nicht ohne weiteres sagen. Lediglich die Erfahrungen mit der Methode geben einen Anhalt und unsere hierin zur Zeit wohl erfahrensten Experimentatoren Miquel und v. Freudenreich halten diesen Fehler für ganz unbedeutend. Für Hefen glaubte Hansen[1]) aber auch einen sichtbaren Anhalt gewonnen zu haben. Aus jedem Einzelkeime entwickelt sich nach dem Schütteln und Vermischen des Inhalts am Boden des Kolbens ein „Hefefleck," so dass ein einziger Hefefleck sicher beweist, dass nur ein Keim in den betreffenden Kolben gelangt ist. Dass die einzelne Hefezelle mit ihren etwaigen untrennbaren Sprossen unter diesem Einzelkeime zu verstehen ist, geht aber wohl aus allem Vorausgegangenen hervor und bei allen diesen Versuchen ist die höchste, leidlich sichere Leistung immer die Trennung in die einzelnen Arten unter möglichster Trennung der Einzelindividuen.

Die Zahl der Einzelversuche wird bei der Verdünnungsmethode in Flüssigkeiten ohne jede Rücksicht auf den Grad der Verdünnung von Miquel auf 30 bis 40 angegeben, beschränkt sich in der Praxis aber sogar häufig auf etwa 20. Die Berechnung ist demnach etwas willkürlich. Jeder Fehler wird in einer nach dem Grade der Verdünnung wechselnden und oft ganz uncontrollirbaren Weise multiplicirt und macht sich in demselben Maasse mehr störend bemerkbar, als der Grad der Verdünnung gesteigert ist. Soll die Verdünnung wirklich auf leidliche Exactheit Anspruch machen, so müsste verlangt werden, dass die Zahl der Einzelversuche zu dem Grade der Verdünnung in einem bestimmten Minimalverhältnisse steht. Dass aber dann die Zahl der Einzelversuche schon bei mässigem Gehalte an Organismen in die Hunderte und Tausende gehen muss, setzt einer ganz correcten Anwendungsweise dieser Verdünnungsmethode Schranken. Soll die Methode

---

[1]) Compte rendu des traveaux de Laboratoire de Carlsberg 1881—83; Zeitschrift f. wissenschaftl. Mikroskopie 1884. Bd. I., S. 191.

praktisch bleiben, so kann sie nicht weniger als 20 und nicht mehr als 50 Einzelversuche verwenden; dann wird aber der Grad der Exactheit in den weitesten Grenzen schwanken, je nachdem das Ausgangsmaterial wenig oder sehr stark verdünnt werden musste. Diese oft recht groben Fehler der rechnerischen Grundlage muss man auch beachten, wenn die Verdünnungsmethode zur Zählung von Keimen aus Gemischen verwendet wird. Gegenüber diesen Mängeln müssen auch einige Vortheile der Verdünnung in Flüssigkeiten, speciell in Bouillon, angeführt werden. Die Lösungen können jeder wünschenswerthen Temperatur ausgesetzt werden; eine Luftinfection kann nach dem Verschluss nicht mehr eintreten, in Folge dessen können Arten, welche überhaupt langsam wachsen, oder Keime, welche geschwächt sind und deshalb langsam auswachsen, beliebig lange im Versuche bleiben; die Bouillon ist relativ universell verwerthbar, so dass auch viele Arten, für welche sie nicht die beste Lösung ist, so weit heranwachsen, dass man sie mit blossem Auge erkennen kann; die Bouillon gestattet manche Wachsthumseigenthümlichkeiten zu erkennen und dadurch wahrzunehmen, ob verschiedene Arten sich entwickeln.

Da die Gefahr der Luftinfection sich bei jedem Einzelversuche wiederholt und dieser Fehler wenigstens theoretisch sehr störend sein sollte, während er praktisch nach Miquel relativ gering ist, hat Fol[1]) versucht, diesen möglichen Fehler aller bisherigen Versuchsanordnungen nur einmal zuzulassen, alle anderen Manipulationen aber so einzurichten, dass die Gefahr des Luftzutritts möglichst beseitigt wird. Fol nimmt zu diesem Zweck die Verdünnung nicht in sterilisirtem Wasser, sondern in der Nährlösung selbst vor und vertheilt dann erst die inficirte und verdünnte Lösung in die kleinen Kölbchen. Er verfahrt dabei in einer Weise, deren Prinzip zunächst durch die Fig. 36 klar werden dürfte. Die Flüssigkeit B wird längere Zeit bei 110° gehalten, während das Ende des längeren Schenkels des durch trockene Hitze sterilisirten Metallhebers über diese Flüssigkeit bei t steht; mit

[1]) Archives des sciences physiques et naturelles, Bd. XI, 1884, S. 557 und La Nature 1885, No. 615 und 619.

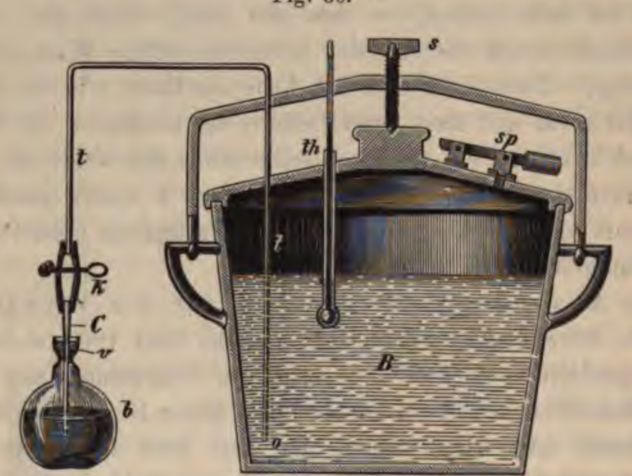
dem anderen Ende wird der gleichfalls vorher schon sterilisirte Trocart C (cf. Fig. 29 [3], S. 275) durch einen starkwandigen sterilisirten Kautschukschlauch fest verbunden. Die Klemmpinzette k, welche geschlossen ein Entweichen der gespannten Dämpfe verhindert, wird dann geöffnet, so dass ein heftiger Strahl des überhitzten Dampfes die Röhre t und den Trocart etwa 10 Minuten durchströmt. Ist auf diese Weise die ganze Verbindung definitiv sterilisirt, so wird die Klemme wieder geschlossen und dann der Trocart C durch den Verschluss v des Kolbens b hindurchgestossen; zu diesem Zwecke wird der Wattepfropf b, Fig. 9 (2, 3), S. 203, abgenommen und geschützt zur Seite gelegt, so dass die hohle Stahlnadel nur die Asbestschicht a und die darunter befindliche dünne Watteschicht w durchdringt. Dann senkt man das Ende der Röhre t in die Flüssigkeit B bis o ein und lässt unter Oeffnen der Klemme k die Flüssigkeit nach b übertreten, sobald dieselbe etwas abgekühlt ist. Nach dem Füllen des Kolbens b wird die Klemme k wieder geschlossen, der Trocart wieder herausgezogen und der Wattepfropf b der Fig. 9 (2) wieder aufgesetzt.

Zur Anwendung des Prinzips für die Verdünnung dient die Bürette, Fig. 37 (1. B.), dieselbe fasst 100 ccm, ist sehr genau graduirt und oben und unten zur Verbindung mit dicken Kautschukschläuchen etwas ausgezogen. Diese Bürette wird durch einen Strom schwefeliger Säure, der aber auch fortbleiben kann, gereinigt und dann zur Sterilisirung und eventuell zur Vertreibung der schwefeligen Säure mit dem Papin'schen Topfe, Fig. 36, so verbunden, wie der Trocart C. Dann lässt man unter Oeffnen der Klemme k und k^1 des Kautschukschlauches eine halbe Stunde lang überhitzte Dämpfe nachströmen, schliesst darauf zuerst die untere Klemme k^1 und fügt in das freie Ende des Kautschukschlauches ein durch Hitze sterilisirtes Glasstäbchen: dann verfährt man mit der oberen Klemme k und ihrem Kautschukschlauche ebenso. Nach dem Abkühlen ersetzt man zuerst das untere Glasstäbchen durch eine sterilisirte Canüle c, welche man in der vorher geschilderten Weise in eine Flasche g^1 mit sterilisirter und durch längeren Aufenthalt im Brütofen geprüfter Bouillon einstösst. Da in Folge der Abkühlung und Condensation der Dämpfe die Luft in B verdünnt

ist, steigt beim Oeffnen der Klemme k^1 die Bouillon durch die Canüle c in die Bürette B, wobei ein Theil der gelösten Luft gasförmig entweicht. Nach Schluss der Klemme k^1 führt man die keimhaltige, zu verdünnende Flüssigkeit, welche sich in der Glasröhre b (Fig. 37 [2]) befindet, in der Weise ein, dass das Ende p an Stelle des oberen Glasstabes über der Klemme k in den Kautschukschlauch eingebracht wird.

Die Röhre b wird zum Gebrauche fertig gemacht, indem das eine Ende p zugeschmolzen, das andere mit Asbestpfropfen a ver-

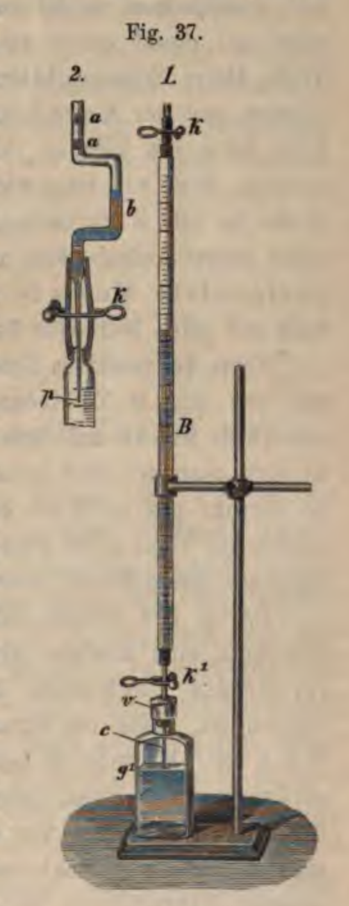
Fig. 36.



schlossen und das ganze durch trockene Hitze sterilisirt wird; über das Ende a kommt dann ein mit Pinzette verschlossener Kautschukschlauch. Die Spitze p der so verbreiteten Glasröhre b wird am Orte der Entnahme noch einmal durch die Flamme gezogen, mit geglühter Scheere abgeschnitten und darauf durch Eintauchen in die bakterienhaltige Flüssigkeit zum Theil, aber nicht ganz gefüllt. Durch Emporrichten der Spitze p wird die Flüssigkeit aus der Spitze entfernt und dieselbe darauf zum Transport wieder zugeschmolzen. Vor dem Einführen in den Kautschukschlauch der Klemme k lässt man durch Oeffnen des über a befindlichen Kautschukschlauches erst einige Tropfen austreten, ehe man den Inhalt von b definitiv zu der Nährlösung in der Bürette B, Fig. 37

(1), eintreten lässt. Die Pinzette über dem Kautschukschlauch a gestattet, die Menge Elüssigkeit, welche man aus b entnehmen will, ganz genau abzumessen. Ist dies geschehen, dann entfernt man wieder die Röhre b, schliesst die Klemme k und mischt den Inhalt B sorgfältig. Die 100 ccm der Mischung, welche die Bürette nun enthält, werden in etwa 25 Reagirgläsern oder Kölbchen vertheilt, welche den Verschluss Fig. 9 (2 und 3) haben, indem die hohle Stahlnadel c in der geschilderten Weise durch den Pfropf a und w durchgestossen und nach dem Herausziehen der Nadel der Wattepfropf b wieder aufgesetzt wird. Die Nadel wird gegen die freie Luft geschützt, indem man sie in einer Hülse unterbringt, welche aus einem mit Asbestpfropf versehenen Glasröhrchen besteht.

Fig. 37.



Die **Verdünnungsmethode in Flüssigkeiten ist trotz ihrer Unbequemlichkeit und trotz mancher Fehler ausgezeichnet zur Reinkultur und Isolirung differenter Arten aus einem Gemische von Mikroorganismen geeignet.** Die rechnerischen Fehler theilt sie mehr oder weniger mit jeder Verdünnungsmethode, bei der ein Theil der Beobachtung durch Berechnung ersetzt werden muss. Bei 40 Einzelversuchen, von denen 25 % zur Controlle steril bleiben müssen, kann man aber höchstens 30 Keime resp. Arten aus einem Gemisch direct herauszüchten und dies kann gerade für medicinische Zwecke dann sehr ungenügend sein, wenn wichtige pathogene Arten mit vielen Saprophyten vermischt sind, wie es z. B. im Darm der Fall ist. Hieraus erklärt es sich wohl, dass in bestimmten Fällen diese Methode, deren

Ueberlegenheit v. Freudenreich, Fol und besonders Miquel anderen Methoden gegenüber nicht genug preisen können, viel weniger leistet als andere rechnerisch sich schlechter stellende Methoden, welche aber direct mehr zeigen. Die französische Choleracommission konnte 1883 die Cholerabacillen, trotzdem sie sich im Besitze dieser „besten“ Methode befand, nicht entdecken und ihr Berichterstatter Strauss sagte damals in seinem Berichte etwas deprimirt: „Il est évident qu'en présence d'une aussi grande diversité d'organismes il est impossible de destinguer et de désigner celui qui plutôt qu'un autre pourrait être la cause du choléra.“ Trotz dieser Schwierigkeiten gelang es der deutschen Choleracommission, mit der Koch'schen Methode den Parasiten zu entdecken. Dies führe ich hier an, um nachdrücklich darauf aufmerksam zu machen, dass wir jetzt nicht mehr irgend einer ideal besten Methode für alle Fälle nachzujagen haben, sondern dass es mehr und mehr unsere Aufgabe sein muss für jeden concreten Fall die geeignetste Methode auszuwählen und dass wir uns deshalb mit allen Methoden bekannt machen müssen.

Trotz der positiven Leistungen von Koch allein 1876 und 1878 und von ihm in Verbindung mit seinen Schülern und Mitarbeitern seit 1881, welche auf dieser Auswahl und Anpassung der Methode an dem concreten Fall beruhten, sagte Duclaux[1]) damals: „Nous ne croyons pas qu'il ait eu, ni qu'il y ait encore un autre laboratoire que celui de M. Pasteur, où l'on ait obtenu, d'une manière régulière, des cultures pures des infiniments petits.“

Da in den letzten Jahren umgekehrt von einigen deutschen Forschern eine ähnliche absolute Ueberlegenheit der später zu besprechenden Koch'schen Methode der Plattenkulturen behauptet worden ist, muss ich darauf aufmerksam machen, dass auch die Koch'sche Methode in bestimmten Fällen versagt. Einige Untersuchungen aus meinem Laboratorium von G. C. Wood und Scholl über Choleraparasiten, von Holschewnikoff über Schwefelwasserstoffbildung durch Bakterien haben evident gezeigt, dass die landläufigen Nährsubstrate der Koch'schen Schule durch Medien er-

---

[1]) Ferments et maladies 1883, S. 192.

gänzt werden müssen, welche steril aufgefangen werden und keinerlei Präparation erfahren. Mit derartigen Medien, welche für die Parasiten der acuten Exantheme vielleicht noch einmal positive Resultate zeitigen, kann man aber den vollen Erfolg nur erhalten, wenn man sie vollständig, chemisch und physikalisch unverändert lässt. In diesem Falle kann man derartige, steril aufgefangene, unveränderte Medien nur in Form der Verdünnungsmethode und allenfalls noch unter besonders günstigen Bedingungen in Form der reinen Massenkulturen verwenden.

Diese Ueberlegung über einige wichtige zukünftige Aufgaben der Mikrobiologie müssen wieder die Aufmerksamkeit nachdrücklich auf die in Deutschland jetzt sehr vernachlässigte Verdünnungsmethode in Flüssigkeiten lenken, trotzdem diese Methode viel umständlicher, zeitraubender und weniger übersichtlich ist, als andere bei uns jetzt fast allein gebrauchte Methoden.

---

7. Kulturen in Haarröhrchen nach Salomonsen.

Bei der spontanen Veränderung des Blutes durch Fäulniss beobachtete Salomonsen[1], dass sich im Blute schwarze „Fäulnissflecke“ durch Reduction des Oxyhämoglobin bilden, welche am Boden kreisrund und scharf contourirt, nach obenzu mehr keulenförmig sind, die sich allmählich vergrössern, berühren und dann eine diffuse dunklere Färbung der ganzen Blutmasse hervorrufen. So lange diese Flecke noch isolirt sind, besteht jeder solcher Fleck nach Salomonsen aus einer einzigen Bakterienart, welche durch ihre Vegetation die Farbenveränderung des Blutes bewirkt. Jeder solcher Fleck ist eine Kolonie, eine ächte Reinkultur

[1] Zur Isolation differenter Bakterienformen. Botanische Zeitung 1876, No. 39; Studier over Blodets Forraadnelse 1877; Eine einfache Methode zur Reinkultur verschiedener Fäulnissbakterien. Botanische Zeitung 1880, No. 28. Bakteriologisk Teknik 1885.

einer einzigen Art. Saugt man nun keimhaltiges frisches oder defibrinirtes Blut in Haarröhrchen ein, so entstehen in dem Blute in diesen Röhrchen gleichfalls derartige isolirte Fäulnissflecke. Enthielt das Blut pathogene Bakterien, z. B. von septikaemischen oder pyaemischen Prozessen, so kann man auch diese in den Kapillarröhrchen in Reinkulturen erhalten. Man mus in diesen Fällen nur das Blut gegen secundäre Infection durch Fäulnisskeime schützen und dasselbe so entnehmen, als wolle man es steril auffangen, cfr. S. 228 und 261. Statt wirklicher Kapillarröhren, Lymphröhrchen, kann man auch feine Glasröhren verwenden, welche an einem Ende zur Kapillare ausgezogen werden, Fig. 38. Unter den so entwickelten Kolonien bemerkt man mit schwächeren Vergrösserungen, z. B. mit der Loupe, kleine Differenzen in der Grösse, der Schnelligkeit des Wachsthums und in den Formen (b, c, d, e der zweiten Abbildung von Fig. 38). Jede solche kleine Differenz ist ein sichtbares Zeichen, dass derartige differente Kolonien verschiedenen Bakterienarten ihren Ursprung verdanken. Will man nun solche Reinkultur zu Uebertragungen verwenden, so reinigt man das Röhrchen äusserlich sorgfältig, ritzt es an der gewünschten Stelle mit der Glaspfeile und bricht es durch, taucht eine vorher geglühte und wieder abgekühlte Platinnadel in die Kultur ein und überträgt unter schnellem Oeffnen in eine sterilisirte Lösung.

Fig. 38.



Die Röhrchen erhalten an einem Ende vortheilhaft eine kleine Verengerung oder Knickung, bis zu welcher ein Ppfropf von Baumwolle oder Asbest (a) eingepresst wird, während das zur Kapillare ausgezogene Ende zugeschmolzen ist; das so vorbereitete Ende wird erst in der Flüssigkeit abgebrochen, durch Saugen an dem mit Watte verschlossenen Ende gefüllt, nach dem Herausnehmen mit Alkohol gereinigt und

dann am kapillaren Ende von Neuem zugeschmolzen und ev. mit einem Lack verschlossen.

Aehnlich ist das Entstehen von isolirten Fäulnissflecken oder überhaupt von Bakterien-Kolonien in Substanzen, welche spontan, wie das Blut durch die Bildung der Cruorschicht, fest werden oder gelatiniren, während in wirklichen Lösungen eine solche scharfe Isolirung auch in Haarröhrchen nicht eintritt. Mit Berücksichtigung dieses, damals von Salomonsen noch nicht vollständig erkannten Punktes war diese Methode einige Jahre eine der zuverlässigsten, um wirkliche Reinkulturen zu erzielen.

---

8. Undurchsichtige, feste Nährsubstrate; Kartoffel-Kulturen nach Schröter. Taf. I, Fig. 2.

Ausser in Flüssigkeiten beobachtet man Bakterien spontan auf festen Substraten. Lässt man z. B. eine Scheibe einer gekochten Kartoffel an der Luft stehen, so sieht man von der Kartoffelschale aus sich verschiedene schleimige Massen (c, d) allmählich auf der Kartoffelfläche ausbreiten. Auf der Fläsche selbst bilden sich kleine schleimige Pünktchen (b) von verschiedener Farbe, welche einige Zeit ganz distinct für sich bestehen und erst bei weiterem Wachsthum sich mit anderen berühren, dieselben überwuchern oder von ihnen überwuchert werden.

Diese Beobachtungen wurden von Schröter[1]) zuerst methodisch zu Reinkulturen der Pigmentbakterien verwerthet. Man überträgt mit einer Platinnadel eine Spur eines solchen Schleimtröpfchens, so lange es noch ganz isolirt ist, in der früher S. 277 und 278 angegebenen Weise punkt- oder strichförmig auf eine sterilisirte Kartoffel, welche sich unter einer grossen feuchten

[1]) Ueber einige durch Bakterien gebildete Pigmente. Cohn's Beiträge zur Biologie der Pflanzen, I. Bd., Heft 2, 1872 (2. Abdruck 1881), S. 109.

Glocke, oder in einem kleinen Doppelschälchen oder Reagirglase befindet.

Im ersten Falle bildet sich von dem Impfpunkte ausgehend auf der Kartoffelscheibe eine allmählich nach dem Rande zu wachsende Kolonie (b), im andern entwickeln sich in den Impfstrichen erst mehr oder weniger isolirte Kolonien, welche sich später berühren und über den Impfstrich hinauswachsen (a). Für neue Uebertragungen verwendet man nur Kolonien, welche man mit blosem Auge oder mit der Loupe als rein erkennt und von denen man eine andere Spur durch ein Deckglaspräparat mikroskopisch controllirt hat. Ein Theil der Kulturen kann bei Zimmertemperatur, ein anderer Theil bei höherer Temperatur im Vegetationskasten gehalten werden.

Der grosse Vortheil dieser Methode, welche auch eine gute Methode der Massenkulturen ist, gegenüber den früher geschilderten Methoden der Massenkulturen in durchsichtigen flüssigen Medien besteht darin, dass jeder absichtlich geimpfte oder durch Luftinfection auf die Kartoffelscheibe gelangte Keim isolirt am Orte seiner Berührung mit der Kartoffel zu einer Kolonie auswächst, während in den Flüssigkeiten sich differente Keime vermischen.

In Flüssigkeiten resultirt unter diesen Umständen wohl auch einmal eine Reinkultur, aber man hat es nicht immer sicher in der Hand den Organismus vorher zu bestimmen, der in der Reinkultur auftreten soll. Bei den Kartoffelkulturen dagegen ist man in der Lage den gewünschten Organismus durch die Eigenthümlichkeit seiner Zoogloea frühzeitig zu erkennen und ihn deshalb rechtzeitig zu übertragen und dadurch von anderen zu trennen und so nach einigen Uebertragungen rein zu kultiviren. Man muss nur die Uebertragungen so frühzeitig vornehmen, als die kleinen, aus einem Keime oder Keimconglomerate hervorgegangenen Kolonien noch ganz isolirt und in Folge der Isolirung einheitlich und rein sind. Die Grenzen der Methode liegen darin, dass die Kartoffeln nicht allen Organismen günstige Existensbedingungen bieten und darin, dass viele, sonst auf den Kartoffeln wachsende Organismen, nicht genügend augenfällig wachsen. Das letztere ist wichtig, weil man bei den festen undurchsichtigen Medien auf das blose Auge oder auf Loupenvergrösserung angewiesen ist.

Nach wichtiger sind nach Koch[1]) die Uebertragungen auf Kartoffeln oft, wenn man sich darüber orientiren will, ob anderweitig gewonnene Reinkulturen, besonders von pathogenen Bakterien, die Fähigkeit haben auf pflanzlichen Substraten zu vegetiren. Man impft dann die sterilisirten Kartoffeln in der früher angegebenen Weise mit diesen Reinkulturen. In dieser Weise ist es Pawlowsky sogar gelungen die Tuberkelbacillen auf Kartoffeln zum Wachsen zu bringen; nach Impfung wurden die Reagirgläser zugeschmolzen und blieben ca. 6 Wochen im Thermostaten bei 37°.

---

9. Durchsichtige, feste Nährsubstrate; Blutserum nach Koch.

Für die durchsichtigen festen Nährsubstrate, S. 261 u. 267, als deren Typus wir das Blutserum nach Koch[2]) betrachten, gilt fast dasselbe wie für die undurchsichtigen festen Substrate. Der Vortheil besteht darin, dass man dieselben wegen ihrer Durchsichtigkeit mit stärkeren Vergrösserungen beobachten und deshalb Veränderungen oft früher bemerken kann. Ein weiterer Vortheil besteht noch darin, dass dieselben durch ihren besonderen Chemismus sich vorzüglich für das Wachsthum vieler pathogener Arten eignen. Da die letzteren aber im Allgemeinen empfindlicher sind als die saprophytischen Organismen und unter den wählbaren Bedingungen von letzteren leicht überwuchert werden und manche pathogene Bakterien langsam wachsen, so ist die reine Entnahme des Ausgangsmaterials das wichtigste Moment.

Dieses Material muss eben so sorgfältig entnommen werden, als wollte man Blut oder Gewebssaft steril auffangen, weshalb ich

[1]) Mittheilungen aus dem K. Gesundheitsamte 1881, I; 1884, II.

[2]) Berl. klin. Wochenschrift 1882, No. 15. Mittheilungen a. d. K. Gesundheitsamte 1884, Bd. II, S. 48.

auf das S. 226 Gesagte verweise und nur noch einige Ergänzungen bringe. Um speziell die in den Tuberkelknötchen befindlichen Bakterien frei zu machen, zerschneidet man mit abgekühltem Messer oder Scheere ein Knötchen und versucht aus dem Innern mit abgekühlter Platinöse Partikelchen zu entnehmen, die man auf die Oberfläche des Blutserums impft, oder man zerquetscht bei zu grosser Härte ein Knötchen zwischen zwei abgekühlten Skalpellen und nimmt diese zerquetschte Masse mit Platindraht, um sie zu verimpfen. Bei weniger harter Consistenz schneidet man mit abgekühltem Messer ein und entnimmt das Material mit der Platinöse.

Zur Entnahme von Hautstückchen wählt man bei Erysipelas und ähnlichen in der Haut verlaufenden parasitären Prozessen eine Stelle, an welcher der Prozess vorwärts schreitet. Die Haut wird in der früher angegebenen Weise gereinigt und dann mit geglühten Instrumenten ein Stückchen Haut herausgeschnitten, welches event. noch weiter zerkleinert resp. zerquetscht wird.

W. und R. Hesse[1]) schlugen folgendes Verfahren ein um die anaërobiotischen Bacillen des malignen Oedems zu gewinnen, nachdem durch mehrere Impfungen von Maus zu Maus die übrigen zuerst mit übertragenen Bakterien beseitigt waren und das subcutane Gewebe, der an der Schwanzwurzel geimpften Mäuse eine Reinkultur repräsentirte. Nach Aufspannen der Mäuse wurden die Haare am Rücken und an den Seiten mit dem Paquelin'schen Platinbrenner, event. mit Galvanokauter abgesengt; event. ist statt dessen eine sorgfältige Reinigung mit Bürste, Seife und Sublimat anzuwenden. Darauf wird ein breiter Streifen aus der Rückenhaut gebildet, indem von dem einen Hinterbeine die Seite hinauf bis zum Halse, über den Hals hinweg und die andere Seite hinunter bis zum anderen Hinterbeine ein bis auf die Haut gehender Schnitt geführt wird. Dieser Streifen wird mit geglühter Pinzette gefasst und soweit zurückgeschlagen, dass er hinter dem Thiere mit Nadeln befestigt werden kann und etwa die Mitte des Rückens frei liegt. An der so gebildeten Falte werden Stückchen ausgeschnitten und

---

[1]) Deutsche med. Wochenschrift 1885. S. 214.

in Agar oder in Gelatine tief eingesenkt, um die Luft möglichst abzuschliessen.

Ist schon einige Zeit nach dem Tode verstrichen, so müssen die Organe erst gründlich von aussen anhaftenden Fäulnissorganismen gereinigt werden. Nach Koch l. c. erreicht man dies, indem man das Organ wiederholt und gründlich in 1 p. M. Sublimatlösung wäscht, dann mit zu jedem Schnitte gewechselten, heissen Instrumenten von der Oberfläche ab Schichten des Organs abträgt und erst in grösserer Tiefe den Gewebssaft oder Gewebspartikel entnimmt.

Bei grösseren Organen, z. B. der Milz, legt man nach Gaffky[1]) nach gründlichem Waschen in 1 p. M. Sublimatlösung zuerst einen fast das ganze Organ trennenden Längsschnitt. Dann wird mit einem zweiten sterilisirten Messer auf die gewonnene reine Schnittfläche ein nirgends bis an die Kapsel reichender Schnitt geführt, auf diesen ein dritter und erst dann aus der Tiefe Gewebssaft oder Partikel entnommen.

Nach Löffler[2]) verfährt man, um selbst hochgradig verunreinigte Organe noch zu verwerthen, derart, dass man das Organ erst 10 Minuten, unter stetem Bewegen mit einem Glasstabe, in einer 5 $^0/_0$ igen Karbolsäurelösung lässt, um alle an der Oberfläche haftenden Kokken, Bacillen, Hefen etc. zu vernichten. Zum Vernichten etwaiger Bacillensporen kommt dasselbe dann noch 5 Minuten in 1 $^0/_0$ Sublimatlösung. Dann wird es herausgenommen und auf reines Fliesspapier gelegt. Wenn die Oberfläche trocken geworden ist, schneidet man mit heissem Messer die bindegewebige Umhüllung ein, reisst das Organ, indem man die Schnittränder mit heissen Pinzetten fasst, auseinander und entnimmt aus der Tiefe an diesen Rissflächen das Impfmaterial.

Es versteht sich wohl von selbst, dass man nicht nöthig hat, den schulgerechten Gang einer Section inne zu halten, sondern dass man sich in erster Linie durch den Zweck bestimmen lässt und

[1]) Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte. 1884, Bd. II, S. 386.

[2]) ibid. S. 451.

möglichst schnell und vorsichtig das Organ in Arbeit nimmt, aus dem die Kulturen angelegt werden sollen.

Um die Vortheile des schräg erstarrten Blutserums oder auch der Kartoffeln für die Kultur von Rotzbacillen auszunützen und die bei unmittelbarem Impfen des festen Nährbodens mit dem unreinen Rotzmaterial eines mit der Luft in Verbindung gewesenen Scretes zu befürchtende Ueberwucherung der Rotzbacillen durch die mitübertragenen Saprophyten auszuschliessen, schickte Löffler[1]) die Verdünnung in Flüssigkeiten voraus. Man verdünnt das verdächtige Secret mit 100 bis 1000 ccm sterilisirten Wassers und impft mit diesem verdünnten Material eine grössere Anzahl Gläser mit schräg erstarrtem Blutserum. Die etwa entstehenden verdächtigen Kolonien müssen dann auf neue Gläser übertragen werden. Für diesen speziellen Fall ist übrigens nach Löffler die Uebertragung auf Meerschweinchen viel sicherer.

---

10. Die Kulturen auf durchsichtigem, gelatinirendem Nährboden nach Koch.

Bis zur Mittheilung dieser Methode[2]) waren an Thatsachen, welche sich zur Herstellung von Reinkulturen in bestimmten Fällen bewährt hatten, ermittelt:

1. Die Vortheile des festen, undurchsichtigen Nährbodens für die isolirte Kultur charakteristischer Bakterien durch Schröter.
2. Die Möglichkeit des isolirten Wachsens von reinen Bakterienkolonien im Blute und die Möglichkeit der Differentialdiagnose solcher Kolonien mit schwachen Vergrösserungen durch Salomonsen.

---

[1]) Arbeiten a. d. K. Gesundheitsamte 1886, Bd. I, S. 194.

[2]) Zur Untersuchung von pathogenen Organismen. Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte, Bd. I. 1881, S. 1.

3. Die Vortheile durchsichtiger Medien für viele Fälle durch Pasteur, Cohn, Brefeld.
4. Das Prinzip des Ausganges von einem Keime durch Brefeld, Pasteur, Lister, Nägeli, Fitz.
5. Bei Anwendung dieses Prinzips die Nothwendigkeit der örtlichen Trennung durch Verdünnung in Flüssigkeiten, um jedem solchen einzelnen Keime die Möglichkeit zu geben, isolirt und rein sich zu vermehren.
6. Die Einführung der Gelatine durch Vittadini, Klebs und Brefeld als Nährmedium und um die Verdunstung von Nährflüssigkeiten aufzuheben.

Diese Vortheile waren bis zu Koch immer nur isolirt zur Anwendung gekommen. Das verbindende Glied, welches gestattet, die meisten dieser Vortheile derart zu vereinigen, dass durch diese Verbindung die universellste und zugleich einfachste aller Methoden resultirte, fand aber erst Koch.

Auf festem Nährboden wachsen durch absichtliche oder Luftinfection hinaufgelangte Keime, wie früher schon geschildert, zunächst isolirt zu einer Kolonie aus. Ist dieser feste Nährboden undurchsichtig, so gelingt eine genügende Beobachtung nur bei besonders charakteristisch wachsenden Mikroorganismen, wie es z. B. die Pigmentbakterien sind. Ist aber der Nährboden nicht nur fest, sondern gleichzeitig durchsichtig, so kann man mit Hülfe schwacher Vergrösserungen auch Kolonien unterscheiden durch Eigenthümlichkeiten des Wachsthums, welche für das blose Auge oder Loupenvergrösserung nicht mehr deutlich wahrnehmbar sind. Koch vereinigte zunächst die Vortheile des festen Nährbodens zur Trennung differenter Keime mit den Vortheilen, welche der durchsichtige Nährboden zur directen mikroskopischen Beobachtung bietet. Diese gleichzeitige Betonung der Festigkeit und Durchsichtigkeit unterscheidet bereits Koch's erste Methode von allen anderen vorausgegangenen Methoden.

Koch schlug zur Erreichung dieses Zieles zwei ganz verschiedene Wege ein, indem er einmal die schon unter 9 besprochenen

festen durchsichtigen Nährmedien wählte, welche ohne jeden Zusatz diesem Postulat gerecht wurden, und zweitens, indem er gewöhnliche klare Nährlösungen durch gelatinirende Zusätze zum Erstarren brachte.

Diese letzteren, welche zur Auffindung des Prinzips der Festigkeit und Durchsichtigkeit führten, und zeitlich dem anderen Wege vorangingen, gewann Koch dadurch, dass er zu den früher bekannten Normal-Nährlösungen und zu bewährten Decocten und Infusen so viel Gelatine zusetzte, dass diese Lösungen bei Zimmertemperatur zu einem durchsichtigen festen Nährboden erstarrten. Impfte Koch nun in eine solche „Nährgelatine", so lange sie noch nicht ganz fest, sondern noch zähflüssig war, von einer bakterienhaltigen Flüssigkeit eine Spur, so wurde beim vollständigen Erstarren jeder einzelne Keim für sich von einer Gelatineschicht umhüllt. Waren nicht zu viele Keime hineingeimpft worden, so blieben sie in Folge des Festwerdens der Gelatine genügend getrennt, so dass jeder Keim am Orte der Fixirung isolirt zu einer Kolonie heranwachsen konnte. Liess man die gelatinirte Lösung auf einer durchsichtigen Glasplatte erstarren, so konnte man diese Entwicklung der Kolonien aus den einzelnen Keimen mit dem Mikroskope schon zu einer Zeit direct beobachten, in der die Loupe oder das blosse Auge noch keinerlei Entwicklung erkennen liessen.

Die gelatinirenden Zusätze dienten bei Koch nicht, wie bei Klebs und Brefeld, zur Verhütung der Verdunstung; die bessere Nährfähigkeit war nicht, wie Brefeld betonte, eine erwünschte, sondern im Prinzip eigentlich eine unerwünschte Nebenwirkung und die gleichfalls von Brefeld hervorgehobene Möglichkeit der Umkehrung gelatinirter Nährtropfen zur Vermeidung der Luftinfection wurde theoretisch ganz nebensächlich, weil auf dem festen Nährboden auch die aus der Luft stammenden Keime sich streng localisirt entwickelten, so dass sie durch den Ort der Entwicklung leidlich von den absichtlich hineingebrachten Keimen auseinanderzuhalten waren. Hierzu kommt noch, dass sowohl Klebs als Brefeld, um gelatinirende Zusätze in ihrem Sinne anzuwenden, schon vorher, der eine durch fractionirte Kultur, der andere durch Verdünnung, Reinkulturen haben mussten. Es findet sich weder bei Klebs noch

bei Brefeld die geringste Andeutung eines Versuches oder nur einer Idee, das Gelatiniren der Lösungen zur Trennung von differenten Keimen, zur Herstellung von Reinkulturen zu benutzen, wie es Koch aufs schärfste postulirte. Auch Schoenauer und Miquel haben gegen 1876 bis 1879 gleichfalls Obst-Gelée und Gelatine zur Bakterienkultur verwendet. Da aber Miquel selbst 1885[1]) noch nicht den Unterschied zwischen Verwendung von Gelatine als einfachem Nährsubstrate und zwischen dem Gelatiniren als Mittel zur Trennung und Isolirung erkannt hat, kann von einer Priorität keine Rede sein. Thatsächlich hat Niemand vor Koch mit Bewusstsein und Erkenntniss der prinzipiellen Bedeutung dieses Punktes gelatinirende Zusätze benutzt, um durch das Erstarren der vorher flüssig gemachten Gelatine die einzelnen Keime und Arten zu trennen.

In einer aus lauter gleichen Organismen zusammengesetzten, zuerst durch das Mikroskop, später auch durch das blosse Auge als charakteristisch wachsend erkennbaren Kolonie summiren sich die Eigenthümlichkeiten des einzelnen Organismus. Der Gesammthabitus einer Kolonie kann dadurch höchst werthvoll werden zur Differentialdiagnose von Organismen, die sich sonst der Form nach sehr ähnlich sind. Das Studium der morphologischen Differenzen, welche sich in den reinen Kolonien documentiren, ist es besonders, welches diese bakteriologische Methode zur schnellen und sicheren Orientirung besonders für die Pathologie und Hygiene brauchbar gestaltet hat, da die charakteristischen Differenzen der verschiedenen Arten auf dem festen durchsichtigen Nährboden viel augenfälliger sind als in durchsichtigen (Bouillon, Normalsalzlösungen) oder trüben Lösungen (Milch). Die ersten Beobachter, welche Bakterien-Kolonien in Gelatine richtig sahen und abbildeten, aber nicht richtig erkannten, waren Klebs und Letzerich, indem sie sich Mikrokokkenkolonien aus Plasmazellen hervorgehend dachten, während diese Plasmazellen in der Gelatine aus Hausenblase selbst nichts weiter als reine Bakterien-Kolonien waren.

---

[1]) Annuaire de l'observatoire de Montsouris pour l'an 1885.

Der Nachweiss, dass eine mit blossem Auge und bei schwächeren Vergrösserungen (bis zu etwa 80 bis 120 fach) sich einheitlich repräsentirende und charakteristisch wachsende Kolonie aus einem einzigen Keime hervorgehen kann, war vor Mittheilung der Methode sicher gestellt. Bei Kultur-Hefen waren die Formen der Kolonien nicht immer genügend unterschieden, besonders bei solchen Arten oder Rassen, deren Einzelzellen nicht sehr different waren, so dass Hansen für diese Organismen jedesmal die Entwicklung der Kolonien aus einem Keime am gelatinirten hängenden Tropfen in der feuchten Kammer direct verfolgt, wenn er solche Kolonien als Ausgang für absolut reine Massenkulturen in der Gährungs-Technik verwenden will. Bei einiger Uebung lernt man ziemlich sicher beurtheilen ob eine Kolonie einen einheitlichen Ursprung hat gleichgültig ob sie aus einem einzigen Keime oder einem einheitlichen Keimconglomerate hervorgegangen ist, oder ob sie aus einer Vereinigung mehrerer differenter Kolonien hervorgegangen ist. Eine absolut sichere Trennung in die einzelnen Keime ist auch durch die Verwendung der Gelatine nicht erreichbar, wie schon früher bei der Verdünnungsmethode dargelegt wurde. Dieser Fehler ist praktisch wenig bedenklich, weil er durch einige successive Uebertragungen eliminirt werden kann. Die Art wie ein Keim zu einer Kolonie auswächst und eine charakteristische Kolonie bilden kann, ist absolut entscheidend nur zu lösen durch Beobachtungen von einem Keime in der feuchten Kammer, praktisch aber durch Vergleich vieler einzelner Kolonien kaum weniger sicher zu ermitteln durch neue Uebertragungen, welche mit mikroskopisch geprüften Kolonien ausgeführt werden.

Zum Bestimmen der Arten gibt gerade die Kultur in flachen Gelatineschichten eine Reihe guter Anhaltspunkte, von denen am längsten bekannt ist, dass einzelne Arten die Gelatine verflüssigen, während andere die Gelatine fest lassen. H. Buchner[1]) glaubte Gewicht darauf legen zu sollen, dass einzelne Arten isodiametrische Kolonien bilden, während andere anisodiametrisches, ungleichmässiges Wachsthum zeigen. Leider liegen diesen Differenzen keine durch-

---

[1]) Archiv für Hygiene 1885, III, S. 364.

greifenden Gattungsmerkmale zu Grunde. Da man aber jetzt schon das Wachsthum vieler zymogener und pathogener Arten in Gelatine kennt, so hat man wenigstens einen ungefähren Anhalt zur Beurtheilung der Art. Man könnte vielleicht nach rein praktischen Gesichtspunkten folgende Gruppen bilden, welche aber natürlich keinen streng wissenschaftlichen Werth haben und nur für den als Anhalt dienen, welcher sich bemüht, die Arten überhaupt etwas zu studiren. Diese Wachsthumseigenthümlichkeiten in Gelatinekulturen verleihen diesen Kulturen geradezu den Werth von Gruppenreagentien.

I. Die Bakterien lassen die Gelatine fest. a) Die Kolonien sind isodiametrisch, im Innern gleichmässig kuglig, an der Oberfläche ziemlich runde, mehr oder weniger prominirende Köpfchen bildend. Hierher gehören z. B. M. aquatilis, B. aquatitilis, B. lactis, eine Reihe pathogener Arten, septikaemische Bakterien, Erysipelas, Pneumonie. b) Die Kolonien sind im Innern ebenso scharf umschrieben, aber an der Oberfläche sind sie anisodiametrisch, bald mehr concentrische, bald mehr blattförmige Anordnung zeigend. Hierher gehören unter anderem einige Nitrate reducirende und Ammoniak nitrificirende Arten, vor allem aber einige toxische Bakterien: die propionsäurebildenden und septikaemisch wirkenden von Brieger, b. coli commune, die sog. Neapeler Cholerabakterien und die Typhoidbakterien. c) Die Bakterien bilden im Innern und an der Oberfläche charakteristische baum-, ast-, wurzel-, schneckenförmige Figuren, z. B. die Bacillen der Mäuseseptikaemie und des Schweinerothlaufs, die Helikobakterien.

II. Die Bakterien zeigen ausgesprochen charakteristisches Wachsthum auf oder in der Gelatine, indem sie blattförmig wachsen, oder wolkige, strahlige, wurzelförmige, schneckenförmige Figuren bilden, oder wie ein Schleier über die Gelatine fortwachsen. Aber früher oder später tritt eine Erweichung und mehr oder weniger intensive Verflüssigung der Gelatine ein. Hierher gehören einige reducirende Arten, einige Eiweissfäulniss bewirkende wie Proteus, einige Kartoffelbacillen, Crenothrix, Cladothrix, und von den pathogenen die Milzbrandbacillen.

III. Die Bakterien bewirken von vornherein eine mehr kreis- oder kraterförmige Verflüssigung der Gelatine, bald mehr nach der Tiefe, bald mehr in der Fläche fortschreitend. Hierher gehören viele der Collectivspecies bakterium termo, bacillus subtilis, einige Pyaemiebakterien und einige aus der wichtigen Gruppe der Spirochaeten oder Kommabacillen. Bei einzelnen Arten schreitet die Verflüssigung fast parallel mit dem Wachsthum, bei anderen reicht die Verflüssigung durch Bildung löslicher Enzyme weiter als das sichtbare Wachsthum.

Unter allen diesen Gruppen wieder giebt es solche mit und ohne Bildung von augenfälligen Pigmenten. Eine scharfe Grenze zwischen diesen Gruppen giebt es nicht, da die Concentration der Gelatine hierauf von Einfluss ist, so dass z. B. manche Arten eine 10 % Gelatine nur erweichen, während sie eine 5 % Gelatine schnell verflüssigen. Man muss deshalb immer dieselbe Concentration, am besten 10 %, zum Vergleiche benutzen.

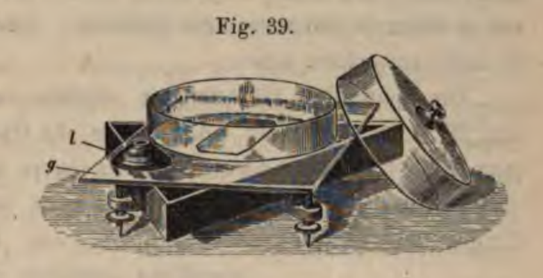
Da mit Fortschreiten der Verflüssigung die Vortheile des festen Nährbodens verloren gehen, hat man diese Formen möglichst schnell von den anderen zu trennen, indem man möglichst wenige Keime verimpft, so dass die Berührung der verflüssigenden mit anderen erst eintreten kann, wenn die Kolonien schon genügend zur Uebertragung entwickelt sind. Man entnimmt immer vom Rande, wo die Verflüssigung eben auf die noch feste Gelatine übergreift, weil im Innern der Verflüssigung schon eine Vermischung mit anderen Formen vor sich gegangen sein kann. Zum Uebertragen wählt man Kolonien, welche bei mikroskopischer Controlle durch Trockensysteme einen durchaus einheitlichen Eindruck machen und bei denen die charakteristischen Differenzen möglichst scharf ausgesprochen sind. Ausserdem ist es zur Controlle erforderlich, von den übertragenen Kolonien mikroskopische Deckglas-Trockenpräparate herzustellen. Unter directer Controlle eines schwachen Trockensystems, oder eines besonderen Präparirmikroskops entnimmt man mit einer sterilisirten Platinnadel die zu übertragende Probe.

a) **Objectträgerkulturen,** 1881; Taf. I, Fig. 1 und 3.

Die im Reagirglase befindliche Gelatine wird durch Aufkochen oder Erwärmen bei ca. 30° im Wasserbade verflüssigt und der

Wattepfropf, soweit er vorsteht, vor dem Oeffnen der Vorsicht halber zur Vernichtung etwa darauf angesammelter Pilz- oder Bakterienkeime in der Flamme verkohlt. Zum Auftropfen der verflüssigten Gelatine legt man eine Anzahl sterilisirter Objectträger, durch übergedeckte Glasglocken gegen Staub geschützt, möglichst horizontal auf einen Tisch oder eine Glasplatte. Am bequemsten bedient man sich hierzu des Apparates Fig. 39, der in verschiedenen Modificationen ausgeführt wird. Derselbe besteht aus einem mit Stellschrauben versehenen Dreieck von Holz, auf welches eine geschliffene Glasplatte g aufgelegt wird. Diese Glasplatte wird mit Hülfe einer Libelle l und der Stellschrauben horizontal eingestellt. Unter der Glasplatte ist Raum zum Anbringen einer Schale mit kaltem Wasser oder Eis, um die Glasplatte stark abzukühlen, wodurch das Festwerden der Gelatine beschleunigt wird. A. Pfeiffer[1]) verwendet einen geschlossenen flachen Kasten aus starkem Zinkblech, der zum Einfüllen von kaltem oder warmem Wasser an einer Ecke eine Eingussöffnung besitzt.

Fig. 39.



Mit einer sterilisirten Pipette nimmt man darauf von der verflüssigten Gelatine und trägt dieselbe durch Auslaufenlassen aus der Pipette in Form eines langen, flachen, einige Millimeter dicken, nirgends den Rand des Objectträgers berührenden Streifens, Taf. I, Fig. 1, auf. War es nicht möglich, die Objectträger ganz horizontal einzustellen, so kann man sich dadurch helfen, dass man die Gelatine durch Eintauchen der Reagiergläser in kühles Wasser oder Unterhalten unter eine Wasserleitung so weit abkühlt, dass sie nicht mehr ganz dünnflüssig ist, sondern eine mehr zähflüssige Beschaffenheit zeigt.

Sind diese Gelatinstreifen so weit erstarrt, dass die Gelatine

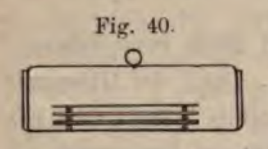
---

[1]) Deutsche med. Wochenschrift, 1887, No. 43.

noch nicht vollständig fest, sondern sehr zähflüssig ist, so impft man dieselben, indem man mit einer sterilisirten Platinnadel eine Spur der zu impfenden Substanz oder Flüssigkeit entnimmt und dieselbe durch leichtes, nicht bis auf den Objectträger reichendes Ritzen strichförmig einträgt durch 3 bis 5 Impfstriche, Taf. I, Fig. 1. Beim vollständigen Erstarren der Gelatine werden dann die Keime fixirt und, wenn nicht zu viele in einem Striche sich befanden, auch von anderen Keimen so weit getrennt, dass jeder isolirt zu einer Kolonie anwachsen kann.

Die geimpften Objectträger werden in eine feuchte Glocke, Fig. 26 S. 270, gebracht. Auf Bänke von Glas oder Zinkblech bringt man 2 bis 4 solcher Objectträger der Quere nach, deckt zum Schutze eine zweite Glasbank darüber, und kann auf diese Weise mehrere Etagen über einander anbringen, Fig. 40. Diese Glasbänke werden sorgfältig gereinigt und vor dem Gebrauche durch Hitze sterilisirt. Derartige Bänke stellt man sich her, indem man etwa 4 cm breite und circa 14 cm lange Streifen von Zinkblech an jedem Rande 1 bis 1,5 cm weit umbiegt, oder indem man auf 4 cm breite und circa 14 cm lange Glasstreifen am Rande schmale Glasleisten mit Canadabalsam aufkittet; noch einfacher ist es, wenn man Glasleisten und breite Glasstreifen getrennt vorräthig hält und die Bänke durch Auflegen der Streifen auf die Leisten nach Bedarf herstellt. Auf diese Bänke legt man einen entsprechend grossen Streifen trocknen Fliesspapiers, auf den die Objectträger kommen. Ein absoluter Schutz gegen Luftinfection wird nicht angestrebt. Die Keime aus der Luft können sich nur auf der Oberfläche der Gelatine ansiedeln und sind dadurch, selbst wenn sie zufällig auf einem Impfstriche oder in unmittelbarer Nähe zu einer Kolonie auswachsen, erkennbar. In Taf. I, Fig. 3, ist bei ca. 15facher Vergrösserung, bei 2 ein solcher Luftkeim dargestellt, dessen Kolonie an einer Stelle auch über den Impfstrich hinübergewachsen ist. Das Wachsthum der Kolonien im Impfstriche controllirt man mit schwachen Trockensystemen bei 80 bis 150facher Vergrösserung. Sind in einem Impfstriche verschiedenartige Kolonien gewachsen, so überträgt man bei der zweiten Impfung durch Ent-

Fig. 40.



nahme der Probe unter Zuhülfenahme eines Präparirmikroskops, bei 15 bis 20facher Vergrösserung, von jeder solchen differenten Kolonie auf besondere Objectträger, so dass man nach einigen Uebertragungen auf jedem Objectträger nur eine einzige Art hat.

Diese Objectträgerkulturen haben noch grosse Mängel und sie leisten zum Trennen differenter Arten aus einem beliebigen Gemische lange nicht so viel wie die Verdünnungsmethode in Flüssigkeiten, ja sie sind zu diesem Zwecke eigentlich ganz unbrauchbar. Wenn die Methode Koch und seinen Schülern 1881 bis 1883 Erfolge verschaffte, so lag dies wesentlich an einem damals nicht genügend gewürdigten Umstande, dass nämlich das Ausgangsmaterial von vornherein durch vorbereitende Massenkulturen in Form der Thierversuche bei Koch, Gaffky und Löffler, in Form der Gährungsversuche bei meinen Untersuchungen schon fast rein war. In Folge dessen wurden die Objectträgerkulturen in den Impfstrichen von vornherein fast als Reinkulturen angelegt und unter diesen besonderen Umständen wurden wenige mit übertragene andere Keime nicht störend, weil sie sich auf der Gelatine isolirt entwickeln konnten und durch ihre Minderheit als die unächten verriethen. Es war nicht so sehr die Trennung in differente Arten überhaupt, als vielmehr die Möglichkeit, Verunreinigungen unter diesen besonderen Umständen zu erkennen und zu isoliren, was die Methode der Objectträgerkulturen bei den vorausgeschickten, unerlässlichen vorbereitenden Massenkulturen zur Isolirung bestimmter Arten geeignet machte.

Bei ähnlichen Vorbereitungen hat Pasteur zweifellos früher bereits in Flüssigkeiten sichere Reinkulturen erlangt, aber er vermochte bei den dauernden Uebertragungen in Flüssigkeiten das Einschleichen von Verunreinigungen nicht sicher zu controlliren, so dass bei ihm die Gefahr bestand, dass auch tadellos reine Anfangskulturen allmählich unrein wurden. Koch dagegen übertrug das einmal rein gewonnene Material in Gelatinestichkulturen, in denen nachträgliche Verunreinigungen leichter zu controlliren und

von vornherein weniger zu befürchten war, wie S. 277 auseinandergesetzt ist.

Die Reinerhaltung des einmal rein erhaltenen Materials durch die Gelatine-Stichkultur war das wirkliche Geheimniss der Erfolge der Gelatine-Objectträgerkulturen. Mir scheint, dass Koch damals die Objectträgerkulturen etwas überschätzt und die viel wichtigere Stichkultur etwas unterschätzt hat. Aber der richtige Ausgangspunkt war auf alle Fälle gewonnen.

b) **Plattenkulturen** [1], Taf. I, Fig. 4.

Erforderlich sind Glasplatten von der Stärke der Objectträger und einer Breite, dass alle Punkte ihrer Oberfläche nach einander mikroskopisch zugänglich gemacht werden können; das Verhältniss der Breite zur Länge beträgt je nach der Breite des Objecttisches des Mikroskopes etwa 8 : 14 oder 10 : 12 cm. Diese Platten werden in der früher angegebenen Weise gereinigt und sterilisirt. Nach dem Abkühlen wird eine solche Glasplatte auf die Spiegelscheibe des Horizontal-Apparates, Fig. 39, gelegt und durch Ueberdecken einer reinen Glasglocke gegen Staub geschützt. Die Gelatine wird darauf im Wasserbade bei 30 bis 40° oder durch Aufkochen verflüssigt und wieder soweit abgekühlt, dass sie noch eben gut flüssig ist. Der festsitzende Wattepfropf des Reagirglases wird durch Drehen mit einer vorher geglühten Pinzette gelockert, so dass das Abnehmen leicht und schnell vorgenommen werden kann; nothwendig ist es, die oberen Parthien des Wattepfropfs und den Glasrand durch Erhitzen in der Flamme von etwaigen daraufgefallenen Keimen zu befreien. Ist das Reagirglas mit der Gelatine derart vorbereitet und der Glasrand wieder abgekühlt, so wird es mit Daumen und Zeigefinger der linken

[1]) Zuerst demonstrirt bei Gelegenheit der Hygieneausstellung und in einem Vortrage von Koch auf dem XI. deutschen Aerztetag 1883 zu Berlin. Specielle Anweisungen zu diesen Kulturen sind von Biedert als Separat-Abdruck aus der deutschen Medicinal-Zeitung 1884 und von Johne über die Koch'schen Reinkulturen 1885, 2. Auflage, im Anschlusse an die sogenannten Cholerakurse erscheinen.

Hand gefasst und möglichst schräg gehalten, aber ohne dass die Gelatine den Watepfropf berührt. Darauf taucht man den vorher geglühten und wieder abgekühlten Platindraht oder die Platinöse in das zu übertragende Material, fasst den Glasstab, in welchem der Platindraht eingeschmolzen ist, schreibfederartig mit der rechten Hand, nimmt mit Pinzette oder mit 4. und 5. Finger der rechten Hand den lockeren Wattepfropf ab und führt den geraden Platindraht oder die Platinöse in die flüssige Gelatine ein, bewegt ihn darin hin und her, streicht ihn an der Wand ab, zieht den Glasstab heraus, wobei die Platinöse aber immer leer sein muss, setzt schnell den Wattepfropf wieder auf. Darauf wird durch Drehen, Neigen und leichtes Schütteln das eingebrachte Material möglichst gleichmässig in der flüssigen Gelatine vertheilt. Dann giesst man die flüssige Nährgelatine mit den in ihr möglichst gleichmässig vertheilten Keimen auf die Mitte der Glasplatte und vertheilt die Gelatine auf derselben mit einem durch Glühen sterilisirten und wieder abgekühlten Glasstabe oder Platindraht oder mit dem durch das Glühen sterilisirten und wieder abgekühlten Rande des Reagirglases selbst, der aber während der ganzen Procedur nie mit den Fingern berührt werden darf. Die Gelatine soll den Rand der Platte nicht direct berühren. Diese Platte wird in einer feuchten Glocke auf eine Glasbank gelegt und darüber eine zweite Glasbank gestellt, so dass auch hier mehrere Etagen von Glasplatten in einer Glocke Platz finden können.

Während bei den Objectträgerculturen nicht die ganze Gelatine, sondern nur die Impfstriche und ihre nächste Umgebung ausgenutzt werden, und während ausserdem eine relativ grosse Menge von Keimen auf relativ wenig Impfstriche zur Vertheilung kommt, wird bei den Plattenkulturen eine relativ kleine Menge Keime auf eine verhältnissmässig viel grössere Menge Gelatine vertheilt. Dementsprechend ist die Vertheilung der Keime in der noch flüssigen Gelatine eine weit bessere, so dass die einzelnen Keime, durch die erstarrende Gelatine fixirt, weiter von anderen Keimen getrennt, isolirt zur Entwicklung einer Kolonie kommen können. In Flüssigkeiten verbreiten sich einerseits die Bakterien

selbst durch die ganze Lösung, aber auch ihre Stoffwechselproducte werden schnell und gleichmässig durch die ganze Flüssigkeit verbreitet. Die Bakterien wachsen deshalb im Allgemeinen in Lösungen schneller, aber die Flüssigkeit wird auch deshalb schneller ausgenützt und erschöpft, weil die Stoffwechselproducte bei einer gewissen Menge dem weiteren Wachsthum ein Hinderniss setzen. In der Gelatine dagegen wird nicht das ganze Nährmaterial auf einmal zugänglich, sondern nur das der nächsten Umgebung, soweit das wirkliche Wachsthum oder ausgeschiedene Enzyme reichen, der andere Theil der Gelatine bleibt unverändert in Reserve und wird nur mit dem Wachsthum in Angriff genommen. Die löslichen Stoffwechselproducte dagegen werden durch Diffusion langsam in der ganzen Gelatine vertheilt und häufen sich nur langsam in der nächsten Umgebung an. Eine Anhäufung von Stoffwechselproducten, welche das weitere Wachsthum hindern, findet in Gelatine langsam statt, so dass die einzelnen Kolonien hinreichend Zeit haben, ihr charakteristisches Wachsthum zu erreichen; diese Anhäufung ist aber in der nächsten Umgebung von Impfstrichen bei der Objectträgerkultur mit ihren vielen Keimen schneller zu erwarten, als auf Platten, auf denen die einzelnen Keime weiter von einander getrennt sind. *Die Plattenkultur bietet* deshalb *zunächst die mechanischen Eigenthümlichkeiten des festen Nährbodens*, der allerdings immerhin noch mindestens 90 % Wasser enthält, *in einer verbesserten Form.* Welche enorme Anzahl von Keimen auf diese Weise sicher von einander auf einer einzigen Gelatinplatte getrennt werden können, zeigt die Fig. 4 der Taf. I, bei welcher jeder Kolonie ein isolirter Keim entspricht und in der erst wenige Kolonien sich berührt haben.

Die *Plattenkultur* mit gelatinirenden Lösungen *fügt zu den schon früher erwähnten Vortheilen der durchsichtigen und festen Nährmedien* noch die weiteren *Vorzüge der Verdünnungsmethode, sie ist eine vereinfachte Verdünnungsmethode.* Gegenüber der Verdünnung in gewöhnlichen Lösungen hat sie den enormen praktischen Vortheil, dass die ganzen Manipulationen schnell hinter einander ausgeführt werden und sich nicht so oft wiederholen als Keime vorhanden sind resp.

als Einzelversuche nöthig wären. Bei der grossen Zahl von Einzelkolonien, welche auf einer Platte ungestört zur Entwickelung kommen können, bietet sie den grossen Vorzug gegen alle anderen Methoden, dass man direct sehen und zählen kann und nicht die Fehler einer Rechnung mit vielen unbekannten Grössen in den Kauf nimmt. Wie bei jeder Verdünnungsmethode ist auch bei der Plattenkultur das Resultat um so zuverlässiger und gleichmässiger, je geringer verhältnissmässig die Zahl der Keime ist. Die Abweichungen werden um so grösser und ungleichmässiger, je ungünstiger das Verhältniss zwischen Menge der Keime und Menge der Gelatine ist. Selbst aber, wenn eine solche Menge Keime zur Entwicklung kommt, wie auf Taf. I, Fig. 4, ist die Platte immer noch zur Orientirung und zur leichten Isolirung mehrerer Arten brauchbar; dies ist aber in so kurzer Zeit und mit so einfachen Mitteln durch keine andere Methode zu erreichen, so dass sie für diese Fälle auch von Gegnern, wie Fol, verwendet wird, und Miquel findet wenigstens, dass, wenn schon die festen Nährböden „facilement à la séparation rapide des espèces“ brauchbar sind, die Plattenkultur diese Vortheile in Form eines „procédé expéditif et non dépourvu d'élégance“ bietet und Roux sagt darüber: „la culture dans les milieux solides, si instructive, parce qu'elle nous montre la forme des colonies, et si utile parce qu'elle permet une séparation des organismes divers.“

Alle Kolonien, welche Differenzen zeigen, werden nun erst mikroskopisch geprüft und dann von denselben durch eine zweite Uebertragung Reinkulturen hergestellt. Zu diesem Zweck wird unter Controlle des Mikroskops oder des Präparirmikroskops eine Spur von einer reinen Kolonie als Stichkultur in Reagirgläser übertragen oder in zweifelhaften Fällen in neue, verflüssigte Gelatine gebracht und von dieser eine neue Plattenkultur angelegt, in der dann aber bis auf etwaige Luftinfectionen nur dieser eine Organismus zur Entwicklung kommt. Man kann also bei der zweiten Uebertragung schon ganz sichere Reinkulturen haben, von denen man dann die Stichkulturen anlegt. Luftinfectionen sind bei dem Oeffnen und Impfen der flüssigen Gelatine nicht ausgeschlossen, aber einmal sind sie nicht so zu fürchten, wie die Infectionen durch unsicher sterili-

sirte Instrumente und Hände und dann müssen sich auch diese Keime isolirt entwickeln. Hat die Luftinfection beim Oeffnen und Impfen der Reagirgläser stattgefunden, so können sich diese Luftkeime natürlich ebenso in der Gelatine entwickeln, wie die absichtlich hineingebrachten; aber ihre spärliche Zahl wird im Verhältniss zu den übrigen Organismen einen Anhalt ihrer Herkunft geben und dann macht man nicht nur eine einzige, sondern mehrere Plattenkulturen von einem Material, von denen die eine immer die andere controlliren hilft. Hat nach dem Erstarren eine Luftinfection stattgefunden, so ist diese durch ihre ganz oberflächliche Lage meist leicht zu erkennen, wie 2 in Fig. 3, Taf. I.

In der Mehrzahl der Fälle genügt dieses Verfahren. Aber hin und wieder, bei Faulflüssigkeiten, Eiter, Fäces, stark verunreinigtem Wasser, ist die Zahl der mit einem Bakterientropfen, mit einer „Spur" übertragenen Keime so gross, dass keine genügende Isolirung der einzelnen Keime eintritt, sondern dass diese sich berühren vor Auftreten erkennbarer charakteristischer Wachsthumsdifferenzen.

In diesen Fällen muss die Verdünnung noch weiter getrieben werden und dies kann man in zweierlei Weise erreichen.

Wenn man die entwicklungsfähigen Keime oder richtiger die zur Entwicklung gelangten Kolonien genau zählen will, so verbindet man in einer gesondert zu besprechenden Weise die Verdünnungsmethode in Flüssigkeiten mit der Gelatine-Plattenmethode.

Will man aber ohne besondere Rücksicht auf die genaue Zahl der Keime die einzelnen Arten trennen oder eine bestimmte, wichtige Art aus einem keimreichen Gemische isoliren, so verwendet man besser ein zweites Verfahren, welches sich an die fractionirten Kulturen anlehnt. Man impft erst ein Glas der verflüssigten Gelatine in der geschilderten Weise mit einer Platinöse oder Pipette mit dem Ausgangsmaterial, das „Original". Nach gründlicher Vermischung überträgt man aus diesem Glase zur „ersten Verdünnung" in ganz derselben Weise einige, z. B. 5 kleine Tröpfchen. Man hält das Originalglas zwischen Daumen und Zeigefinger, das noch zu inficirende zwischen Zeige-

finger und Mittelfinger der linken Hand, nimmt erst den Pfropf von dem Original ab, legt ihn, mit Pinzette gefasst, zur Seite oder giebt ihn zwischen vierten und fünften Finger der linken Hand, welche dann gleichzeitig zwei Gläser und einen Pfropf zu halten hat. Darauf nimmt man mit viertem und fünftem Finger der rechten Hand den Pfropf von dem zweiten Glase, taucht die Platinöse in das Originalglas und trägt diesen Tropfen in das zweite Glas ein. Durch Hin- und Herbewegen und Andrücken an die Glaswand sorgt man dafür, dass sich beim Herausnehmen kein Gelatinetropfen in der Oese befindet. Man wiederholt dann mit derselben oder einer vorher zurecht gelegten zweiten Platinöse diese Uebertragung noch einmal und fährt so etwa fünfmal fort. Dann setzt man erst den mit der rechten Hand gehaltenen Pfropfen auf das frisch inficirte Glas, dann den in der linken Hand gehaltenen auf das Originalglas. Nun hat man das Original = 0 und die erste Verdünnung = I fertig. Darauf macht man nach Vertheilung der Keime durch Schütteln eventuell noch eine zweite = II und selbst eine dritte, mit III bezeichnete Verdünnung in ganz derselben Weise mit derselben Zahl Tropfen von der je vorausgegangenen Kultur. Man bezeichnet die Gläser schon vorher in der angegebenen Weise mit Blaustift oder durch aufgeklebte Etiquette oder man macht orientirende Zeichen am Wattepfropf selbst, indem man denselben am Original unverändert lässt, während man an den andern Gläsern durch Drehen einiger hervorgezogenen Fäden 1 resp. 2 oder 3 dochtähnliche, vorstehende Merkmale am Wattepfropf anbringt. Jedes dieser Gläser liefert eine mit 0, I bis III bezeichnete Plattenkultur, die man in derselben feuchten Glocke etagenweise unterbringt. Jede dieser Kulturen controllirt die andere.

Hat man so eine Anzahl differente Bakterien getrennt, so macht man von jeder derselben zunächst eine Stichkultur, um das Material rein zu halten und dann in der Regel auch noch eine Plattenkultur, welche dann bis auf eine etwaige Luftinfection eine Reinkultur einer einzigen der in dem ursprünglichen Gemische vorhandenen Arten enthält und damit alle Zweifel an der Reinheit der Kultur beseitigt. Diese Uebertragungen der rein kultivirten Organismen wiederholt man nun zur Gewinnung typischer Kulturen

öfters mit besonders charakteristisch gewachsenen, mikroskopisch geprüften Kolonien, zum Theil in Stichkulturen, zum Theil in neuen Plattenkulturen, um auf diese Weise auch jede gelöste chemische Beimengung des ersten Substrates zu eliminiren.

Die Verflüssigung der Blutserum-Gelatine und ihre Verwendung erfolgt in derselben Weise, wie die der gewöhnlichen Nährgelatinen bei 30 bis 40°.

Soll das Erstarren der vorher verflüssigten Gelatine zum Fixiren der Keime verwerthet werden, so muss die Gelatine vom Momente des Erstarrens ab, immer starr bleiben. Dies geschieht aber keineswegs immer und Koch selbst hat bereits zwei Grenzen erkannt, welche der Verwerthbarkeit der gelatinirten Nährlösungen gezogen sind. Einmal verflüssigt sich die durch Kochen sterilisirte Gelatine in den brauchbaren Concentrationen bei 23 bis 25° und selbst, wenn man dieselbe nach Pekelharing in viel unsicherer Weise bei 80° sterilisirt, verflüssigt sie sich bei 30° C., so dass dieser Nährboden bei Bluttemperatur nicht in festem Zustande verwerthbar ist. Zweitens verflüssigen manche Bakterien die Gelatine durch Enzyme während des Auswaschens und hierdurch wird gleichfalls die Festigkeit des Nährbodens bald aufgehoben.

Weitere Grenzen, wie sie von Malapert[1]) und ich schon vor mehreren Jahren hervorgehoben haben, liegen darin, dass die Gelatine durch ihre chemische oder physikalische Beschaffenheit für manche Bakterien als Nährboden ungeeignet ist und darin, dass manche Bakterien oder Pilze auf derselben, auch ohne die Gelatine zu verflüssigen, so schnell wachsen, dass sie die empfindlicheren und langsamer wachsenden Arten überwuchern, bevor diese bis zu charakteristischen Kolonien herangewachsen sind.

Man kann einige dieser Uebelstände durch Zusatz zur Gelatine oder Bouillon selbst zu beseitigen trachten und Chantemesse und Widal[2]) haben angegeben, dass ein Zusatz von Karbolsäure die Typhusbacillen nicht hemmt, wohl aber die verflüssigenden Bak-

---

[1]) Zeitschrift f. analyt. Chemie 1886, Bd. 25, S. 39.

[2]) Gazette hebdomadaire 1887, S. 146.

terien, welche deshalb schlechter wachsen resp. die Gelatine nicht oder weniger intensiv verflüssigen sollen. Beide Beobachter wollten es auf diesem Wege dahin bringen, dass die Typhusbakterien sich auch unter schwierigeren Verhältnissen und trotz der Anwesenheit verflüssigender Arten nachweisen lassen. Nachprüfungen dieser Methode, welche G. Wood bei mir ausführte, ergaben, dass die Grenze des Karbolsäurezusatzes, welcher das Verflüssigen verhindert, ohne das Wachsthum der Bakterien aufzuheben, nach den Arten zwischen 0,01 bis 0,1 Karbolsäure schwanken kann. Wird diese Grenze nach unten überschritten, so tritt Verflüssigung ein, wird sie nach oben überschritten, so hört das Wachsthum auf und bei zwischen liegenden Concentrationen kann eine Verzögerung in der Verflüssigung eintreten. Man muss die Concentration für die einzelnen besonderen Arten ausprobiren, weil manche Concentrationen die Verflüssigung aufhalten, aber auch das Wachsthum stark beeinträchtigen. Für Typhus- und Cholerabakterien liegt die Concentration nach unseren Versuchen bei 0,01 bis 0,02 % Korbolsäure, wenn das Arbeiten praktisch bleiben soll, doch entwickeln sich schon hierbei weniger Kolonien als ohne Karbolzusatz. Wir haben deshalb auch noch andere Körper versucht, von denen aber nur Glycerin uns allgemeiner verwerthbar scheint, weil es von 4 bis 10 % die Enzymbildung beschränkt und vielfach ganz aufhebt, ohne aber das Wachsthum so stark zu beeinträchtigen wie die Karbolsäure. Für Cholerabakterien liegt die Grenze bei ca. 4 bis 5 %.

Während Vincent[1]) 4 bis 5 Tropfen einer 5 % Karbolsäure zu 10 ccm Lösung vortheilhaft fand, hat Bartoschewitsch[2]) davon keine besonderen Vortheile gesehen. Bei richtiger Verdünnung leistet die Plattenmethode bis jetzt mehr.

Immerhin dürfte zur Differentialdiagnose und zum sicheren Auffinden besonders wichtiger Arten dieser Weg nicht ganz zu vernachlässigen sein. Aber bei Bluttemperatur kann man auch hiermit noch nicht arbeiten und deshalb bleibt der Ersatz der Gelatine

---

[1]) Annales de Micrographie 1890, II, S. 432.

[2]) Referat von v. Etlinger in: Centralblatt für Bakteriologie 1889, VI No. 16 bis 17.

durch 1 bis 2 % Agar-Agar unerlässlich, weil dieser Nährboden bei 37° fest bleibt. Man verflüssigt die Agarlösungen durch Aufkochen und lässt sie dann bis auf ca. 42 bis 45° im Wasserbade erkalten. Unter Beachtung der bei der Gelatine angegebenen Vorsichtsmaassregeln in Bezug auf Oeffnen, Schiefhalten der Gläser beim Impfen, Vermischen der Keime und Wiederverschliessen der Gläser werden diese Proceduren bei ca. 42° möglichst schnell bewirkt und dies kann unbedenklich geschehen, weil eine kurze Einwirkung dieser Temperatur auf die Lebensfähigkeit der Bakterien ohne Einfluss zu sein scheint. Dann wird die Agarlösung auf die Platten gegossen und mit Glasstab, Platinnadel oder Glasrand gleichmässig und schnell ausgebreitet.

Im Gegensatze zur Gelatine, welche durch Eis oder kaltes Wasser zum Erstarren gebracht wird, muss das Erstarren des Agar bei höherer Temperatur geschehen. Man verwendet deshalb statt Eis oder kaltem Wasser, warmes Wasser von 37 bis 38° und erwärmt die Platten gleichfalls vorher auf diese Temperatur.

Lässt man die mit Agar beschickten Platten auf diese Weise nur langsam abkühlen, so werden die Agarplatten meist ebenso schön wie die Gelatineplatten und es tritt keine übermässige Contraction des Agar ein. Lässt man das Erstarren bei Zimmertemperatur schneller vor sich gehen, so kann sich das Agar-Agar beim Erstarren so fest zusammenziehen, dass es sich von der Unterlage abhebt. Um dies zu vermeiden, kann man die vier Ecken mit einem Tropfen Siegellack an die Platten ansiegeln und es empfiehlt sich ein für alle Mal, dem Agar etwas Gummi oder Gelatine zuzusetzen, um seine Adhäsion an Glas zu steigern.

Die Platten mit Blutserum-Agar nach Unna werden wie die gewöhnlichen Agar-Platten angefertigt.

Will man den Nährwerth von Gelatine, Hausenblase, Carragheen und Agar ausschliessen, um den Nährwerth der Zusätze unter reinen Bedingungen zu beobachten, so kann man nach W. Kühne[1]) eine durchsichtige Kieselsäuregallerte verwenden.

---

[1]) Zeitschrift für Biologie 1890, XXVII, S. 172.

Kehrer[1]) empfiehlt zur schnellen Differentialdiagnose die Agarlösungen mit einem einzigen Reagens, z. B. Traubenzucker oder Dextrin oder Kochsalz etc., in geringer, etwa 0,25 %, Menge zu versehen, um auf dieser mageren Gallerte die Wirkung des einen Reagens reiner hervortreten zu lassen, weil Agar an sich in destillirtem Wasser gelöst ein ungenügendes Nährmaterial ist. Das letztere gilt auch von der reinen Gelatine.

Dieses Verhalten hat auch Beyerinck[2]) zur Differentialdiagnose zu verwerthen gesucht. Vertheilt man Hefen- oder Bakterienkeime gleichmässig in Agar oder Gelatine, der die nöthigen Nährsubstanzen der Art fehlen, so entwickeln sich die Kolonien nicht. Giebt man nun auf die Oberfläche an verschiedenen Punkten Tröpfchen, welche die einzelnen zum Wachsthum nöthigen organischen und anorganischen Bestandtheile enthalten, so diffundiren diese in die Gelatine und es treten in derselben Stellen auf, in welchen sich einzelne oder alle diese diffundirten Stoffe vermischen, so dass an solchen Stellen alles Nährmatérial vorhanden ist. An diesen Stellen nun entwickeln sich die Keime in einem „Auxanogramm“ und die Methode nennt Beyerinck Auxanographie. Indem man so allmählich die einzelnen Bestandtheile einführt, kann man bisweilen direct sehen, welche Bestandtheile nothwendig sind. Waren der Gelatine alle erforderlichen Bestandtheile von Anfang an zugesetzt, so kann man in derselben Weise ihr Verhalten gegen Gifte prüfen.

c) Modificationen der Plattenkulturen durch Verwendung von Kölbchen und Rollröhrchen.

Das Verdünnen in einer gelatinirenden Flüssigkeit und das Isoliren der vertheilten Keime durch das Erstarren der flüssigen Gelatine wurde von Klebs und de Bary als das Columbus-Ei der Methodik gefeiert und dies ist bei der ausserordentlichen Bequem-

---

1) Centralblatt f. d. med. Wissenschaften 1885, No. 41.

2) Archives Néerlandaises 1889, XXIII, S. 367. Referat von Ludwig in Centralblatt für Bakteriologie 1890, VII, No. 11; von Koch in Zeitschrift f. w. Mikroskopie 1889, VI, S. 374, und von Klein ibid. S. 525.

lichkeit und Sicherheit dieser Methode auch wohl kaum zu viel gesagt, wenn selbstverständlich diese Methode auch ihre Grenzen hat und sie andere Methoden nicht überflüssig macht. Ohne dieses Princip aufzugeben, lag aber der Wunsch nahe, einige oft störende Fehler der Plattenkulturen zu beschränken oder ganz zu beseitigen. Einmal ist die Luftinfection nicht ganz aufgehoben und dieselbe kann bisweilen recht störend wirken, wenn dieser Fehler grundsätzlich beseitigt sein muss, wie es bei Luftuntersuchungen der Fall ist. Zweitens ist es nicht möglich, die ganze Gelatine auf die Platte zu bringen und ein kleiner Rest bleibt jedesmal im Glase zurück und mit diesem Reste können auch Keime der Beobachtung entgehen.

Schimmelbusch[1]) hat zum besseren Ausschliessen der Luftinfection zwei gleich grosse Glassplatten verwendet, welche durch einen schmalen Rahmen von Pappe getrennt so übereinanderliegen, dass Raum für die Gelatineschicht bleibt. Die verflüssigte und inficirte Gelatinelösung wird auf die untere Platte gegossen, vertheilt, die zweite Glastafel aufgelegt und durch federnde Metallklammern an die untere angepresst. Durch den trockenen Pappestreifen soll genug Luft zutreten können. Die von Langerhans[2]) angegebenen hohlgeschliffenen und mit passender, durch Vaseline abzuschliessender Deckplatte bedeckten Glasplatten sind sehr theuer und lassen zu wenig Luft zutreten.

Salomonsen[3]) und Cramer[4]) haben 1884 zur Vermeidung der Luftinfection vorgeschlagen, die Gelatine in Erlenmeyer'schen Kölbchen statt in Reagirgläsern unterzubringen, dieselbe in diesen Kölbchen zu verflüssigen, zu impfen und erstarren zu lassen. In diesem Falle wird das Gefäss nur während des Inficirens der Möglichkeit der Luftinfection ausgesetzt und es kann kein Verlust an Gelatine eintreten, weil die Gelatine in ihrem ursprünglichen Gefässe bleibt. Der Nachtheil gegenüber den Platten besteht darin, dass

---

1) Fortschritte der Medicin 1888, Bd. VI, No. 16.

2) Zeitschrift f. Medicinalbeamte 1890, S. 220.

3) Fortschritte der Medicin 1884, II. No. 19,

4) Die Wasserversorgung von Zürich und ihr Zusammenhang mit der Typhusepidemie des Jahres 1884. 1885, S. 84.

man die Gelatineschicht vom Boden des Kölbchens her nur mit der Loupe, aber nicht von oben mit stärkeren Vergrösserungen durchmustern kann und dass die Entnahme von Material zur mikroskopischen Prüfung und Uebertragung etwas schwieriger und unsicherer ist. Babes und Cornil[1]) haben später dieselben Erlenmeyer-schen Kölbchen verwendet, aber dieselben mit Pasteur'schen Helmen versehen. Kowalsky[2]) hat die Erlenmeyer'schen Kölbchen so eingerichtet, dass sich die Wand zunächst im rechten Winkel bis zu einer Höhe von 1 cm erhebt und dann erst nach dem Halse zu trichterförmig verengt.

E. Frank[3]) hat die Kölbchen im Boden breiter gehalten und dann dieselben so flach gemacht, dass sie durch zwei annähernd parallele Glaswände begrenzt werden, welche nur in der Mitte durch den mit Wattepfropf versehenen Hals unterbrochen werden. Wilfarth[4]) und Lipez[5]) haben flache Flaschen mit parallelen Wänden angegeben, welche die Oeffnung seitlich tragen; so dass die Kulturfläche von parallelen Wänden eingeschlossen und nirgends unterbrochen ist; die Entnahme des Materials wird dadurch etwas erschwert, doch ist die Beobachtung der Kulturen etwas leichter.

In ähnlicher Weise sind die flachen Gefässe von Schill[6]), Petruschky[7]) und Kamen[8]) eingerichtet.

Flache Gefässe sind bereits 1881 von Koch[9]) selbst bei der Wasseruntersuchung verwendet worden und an derselben Stelle erwähnt Koch zum ersten Male, dass man die im Reagirglase verflüssigte Gelatine mit dem auf Keime zu prüfenden Materiale impfen und dann nach dem Mischen im Reagirglase oder in flachen Schalen

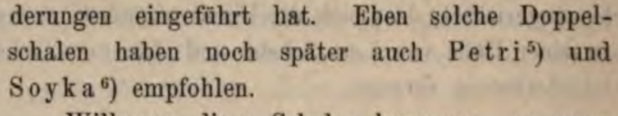
---

1) Les Bactéries 1886. 2. Aufl., S. 96.
2) Wiener klin. Wochenschrift 1888, No. 10—16.
3) Vergl. Fodor: D. med. Wochenschrift 1886, No. 36.
4) Deutsche med. Wochenschrift 1887, No. 28.
5) Centralblatt für Bakteriologie 1887, I. No. 13.
6) Centralblatt f. Bakteriologie 1889, V, No. 10.
7) ibid. 1890. VIII, No. 20.
8) ibid. 1891. IX, No. 5.
9) Mittheilungen 1881, Bd. I, S. 36.

erstarren lassen solle. Dies war das erste Dämmern der Plattenkulturen und ihrer vielen Modificationen.

Salomonsen und Christmas-Dircking-Holmfeld[1]) nahmen die Mischung und Vertheilung der Keime in Gelatine in flachen, gut bedeckten Doppelschalen von Glas vor. Babes und Cornil[2]) und Heydenreich[3]) haben später dieselben flachen Doppelschalen verwendet, bei denen Babes[4]) später kleine Aenderungen eingeführt hat. Eben solche Doppelschalen haben noch später auch Petri[5]) und Soyka[6]) empfohlen.

Fig. 41.



Will man diese Schalen benennen, so muss man sie Salomonsen'sche Schalen nennen, womit ich den etwas eigenthümchen Streit um die Priorität dieser Entdeckung für beendigt halte.

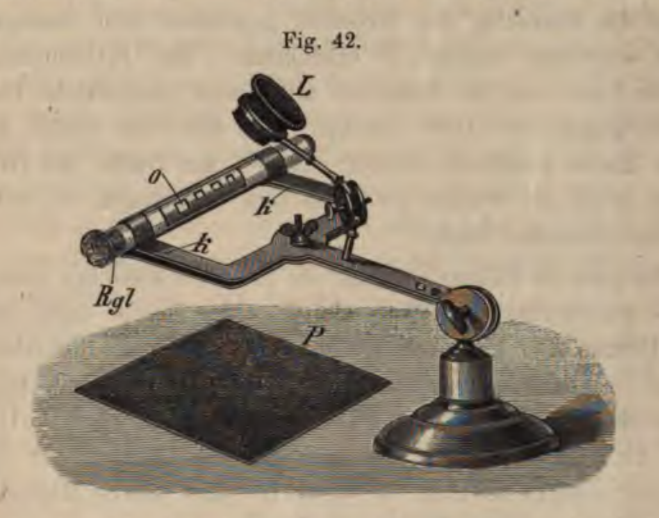
W. Hesse[7]) hatte gezeigt, dass man mit der verflüssigten Gelatine die Wand von Röhren mit einer dünnen Gelatinenschicht überziehen kann, wenn man die Gelatine unter fortwährendem Drehen der möglichst horizontal gehaltenen Röhren unter dem kalten Wasserstrahle einer Leitung langsam erstarren lässt. Sind in der verflüssigten Gelatine Keime vorhanden, so werden sie in dieser dünnen, die Innenwand der Röhre auskleidenden Gelatinenschicht fixirt, wie Hesse selbst später beobachtete[8]). Das Verdienst diese Beobachtungen zuerst in ihrer allgemeinen Bedeutung für die Methodik richtig erkannt und systematisch durchgeführt zu haben, verbleibt Esmarch.[9])

---

1) Forschritte der Medicin 1884, II. No. 3. Salomonsen's Teknik 1885, Fig. 8.
2) Les Bactéries, S. 103.
3) Handbuch. 2. Aufl., 1885.
4) Centralblatt für Bakteriologie 1888, IV, No. 1.
5) ibid. 1887, Bd. I, No. 9.
6) ibid. No. 18.
7) Mittheilungen a. d. K. Gesundheitsamte 1884, Bd. II, S. 182.
8) Zeitschrift f. Hygiene 1888, Bd. IV, S. 22.
9) ibid. 1886, Bd. I, S. 293.

Die Gelatine wird in den Reagirgläsern in der gewöhnlichen Weise verflüssigt und geimpft; durch Hin- und Herbewegen oder leichtes Schütteln werden die Keime vertheilt und dann wird, Fig. 41, die festschliessende Gummikappe G über den Wattepfropf W gezogen. Darauf wird das Röhrchen mit der verflüssigten Gelatine in einer Schale mit eiskaltem Wasser so lange gleichmässig gedreht, bis die Gelatine in dünner Schicht gl das Röhrchen A innen auskleidet. Dann nimmt man das Röhrchen aus dem Wasser, nimmt die Gummikappe ab, damit durch die Watte wieder Luft zutreten kann. War

Fig. 42.



der Wattepfropf durch Gelatine benetzt, so zieht man ihn etwas vor; ist er ganz mit Gelatine befeuchtet, so muss er ev. durch einen frischen ersetzt werden.

Hermann[1]) bewirkt die Herstellung der Rollröhrchen mit einem durch die Wasserleitung getriebenen Rad und Schill[2]) verwendet, um das Benetzen des Wattepfropfes zu vermeiden, kleine Medicinflaschen. Zur gleichmässigen Vertheilung der Gelatine an der Wandung bringt Schill in das die verflüssigte Gelatine enthaltende Rohr ein zweites, entsprechend engereres Reagirglas, so

1) Centralblatt für Bakteriologie 1890. VII, No. 2.

2) ibid. 1889, V, No. 10.

dass die Gelatine zwischen beiden Gläsern sich ausbreiten muss. Eine Verbesserung der einfachen Esmarch'schen Methode vermag ich darin nicht zu erblicken.

Die zur Entwicklung gelangenden Kolonien cl liegen so dicht unter der Oberfläche, dass man sie mit schwachen Systemen betrachten kann. Man kann auch den kleinen Apparat Fig. 42 anwenden, der das Reagirglas Rgl mit Hülfe der Klemmen k k so fixirt, dass man die Kolonien mit der Loupe L bequem betrachten kann. Die Messinghülse trägt verschieden grosse Ausschnitte O, welche das Einstellen der Kolonien gegenüber dem untergelegten Blatte schwarzen Papiers P erleichtern. Zur Erleichterung des Zählens kann man das Röhrchen mit einem Längsstriche Lstr und einigen Querstrichen Qstr versehen. Die Röhrchen dürfen nur am oberen Theile angefasst werden, da bei der Dünne der Gelatineschicht schon die Wärme der Hand zum Verflüssigen der erstarrten Gelatine ausreichen kann.

Da man die flüssige Gelatine der inficirten Röhrchen auch unter dem Wasserstrahle einer Wasserleitung oder Pumpe durch horizontales Drehen zum Erstarren bringen kann, da in den Röhrchen kein Verlust an Gelatine eintritt und die Luftinfection auf ein Minimum beschränkt ist, so sind diese Plattenröhrchen oder Rollröhrchen nicht nur unbedingt die bequemste Modification der Plattenmethode, sondern sie sind so expeditiv, dass andere Methoden des Improvisirens ganz überflüssig erscheinen.

---

11. Verbindung des Prinzips der Verdünnung in Flüssigkeiten mit dem Prinzip der Plattenkultur nach Hueppe.

Die Methode der Plattenkulturen ist aus einer Verbindung der Gelatine-Objectträgerkulturen mit der Verdünnungsmethode in Flüssigkeiten hervorgegangen. Dieselbe hat der Verdünnung in reinen Flüssigkeiten gegenüber den Vorzug, dass man unmittelbar eine

grössere Anzahl der aus den getrennten Keimen hervorgehenden Kolonien sehen kann. Dagegen hat die Verdünnung in Flüssigkeiten den Vortheil, dass man die Keime besser von einander trennen kann als in den zäheren gelatinirten Flüssigkeiten. In Folge dessen ergiebt die Verdünnungsmethode in Flüssigkeiten in der Regel mehr Keime als die Verdünnung durch gelatinirende Lösungen. Besonders bei der Luft- und Wasseranalyse hat sich dies öfters herausgestellt, aber auch bei anderen bakterienreichen Mischungen ist dies beobachtet worden. Fol[1]) behauptet geradezu, dass auf Nährgelatine bei 12 bis 15° nur 4 % der vorhandenen resp. der bei 37° sich in Bouillon entwickelnden Keime zur Entwicklung kommen und Kuisl[2]) fand, dass von 10000 Keimen auf Agarplatten selbst bei 37° nur 50 Kolonien auswuchsen. Ebenso behauptet v. Freudenreich[3]), dass bei der Luftanalyse die Gelatinemethode zu wenig Keime liefert, Hansen[4]) giebt dasselbe für die Wasseranalyse an und Miquel[5]) theilt eine grössere Reihe von Versuchen mit, nach denen für die Luft- und Wasseranalyse die Verdünnung in Flüssigkeiten bessere Resultate gab als die Plattenmethode,

Manche dieser Angaben sind wohl übertrieben und auf nicht ganz richtige Verwendungsweise der Plattenmethode zurückzuführen und sie lassen ausnahmslos die groben rechnerischen Fehler der Verdünnungsmethoden ausser acht. Die zu einem entgegengesetzten Resultate führenden Versuche von Petri[6]) und Bolton[7]) sind zu wenig zahlreich und theilweise zu ungenau um entscheidend zu sein. Die Versuche von Maschek[8]) und viele vergleichende Prüfungen in meinem Laboratorium, bei denen auch die rechnerische Seite und

---

1) Archives des sciences physiques et naturelles 1885, Bd. 13, S. 110.

2) Aerztliches Intelligenzblatt 1885, No. 36.

3) Archives des sciences physiques et naturelles de Genève 1886, Bd. 15, No. 2; 1886, Bd. 16, No. 12.

4) Zeitschrift f. d. gesammte Brauwesen 1888.

5) Annuaire de l'observatoire de Montsouris pour 1888.

6) Centralblatt für Bakteriologie 1887, II, No. 5 und 6; Zeitschrift für Hygiene 1887, III, S. 1.

7) Zeitschrift für Hygiene 1886, I, S. 76.

8) Programm der Oberrealschule in Leitmeritz 1887.

die directe Beobachtung, die Zahl der Kolonien und die entstandenen Arten berücksichtigt wurden, haben keine solche absolute Ueberlegenheit der Verdünnung in Flüssigkeiten gezeigt, doch ist vielfach zweifellos eine Ueberlegenheit in der Trennung der Keime vorhanden.

Gerade bei der Wasser- und Luftanalyse spielt die Zahl der Keime für die Beurtheilung eine etwas grössere Rolle und ich hatte schon früher[1]) angegeben, dass man die Vortheile des Auffangens und Vertheilens der Keime in Flüssigkeiten mit der Plattenmethode combiniren kann. Später hat Miquel[2]) diese Verbindung als procédé oder mèthode mixte nochmals beschrieben und gegenüber der gewöhnlichen Plattenmethode sehr gerühmt.

Die Ausführung geschieht in der Weise, dass man Nährgelatine in Kolben oder Reagirgläser bei 30° flüssig hält, oder dass man Agar aufkocht und bis auf 42 bis 45° abkühlen lässt. Inzwischen hat man die bakterienreiche Flüssigkeit, z. B. unreines Wasser, Faeces, Erde, Schlamm in destilirtes, sterilisirtes Wasser eingetragen und durch Zerdrücken der festeren Partikel mit sterilisirtem Glasstab und durch Schütteln die Keime möglichst isolirt und gleichmässig darin vertheilt. Von dieser Mischung bringt man geringe Mengen als fractionirte Einsaat in mehrere solcher Gläser mit flüssiger Gelatine- oder flüssigem Agar-Agar und vertheilt diese geringe Menge Keime nochmals durch Schütteln möglichst gleichmässig in der Gelatine und lässt diese nunmehr zum Fixiren der Keime erstarren. Sollen die entwicklungsfähigen Keime resp. die zur Entwicklung gekommenen Kolonien möglichst genau gezählt werden, so muss natürlich die Menge des keimreichen Ausgangsmaterials abgemessen und ebenso muss das zum Verdünnen bestimmte Wasser genau abgemessen werden, z. B. 10-, 100- oder 1000 ccm, und jede Verdünnung und Uebertragung muss mit graduirten Pipetten und mit bestimmten Einheiten, z. B. 1 ccm oder bestimmten Theilen eines solchen, vorgenommen werden. Sollen nur die Arten getrennt werden, so kommt es hierauf nicht so genau an. Da für die Differenzirung der Arten die Fractionirung in mehreren Gelatineröhrchen

---

[1]) Methoden 1885, 1. Aufl., S. 111 u. S. 165. 3. Aufl. 1886, S. 163 u. S. 238.
[2]) Annuaire pour 1888.

nach Koch, S. 340, meist viel bequemer und ebenso zuverlässig ist, kommt diese combinirte Methode in erster Linie zum Zählen der Kolonien in Betracht. Die Gelatine und das Agar-Agar werden für diese Fälle am besten in Erlenmeyer'schen oder Franke'schen Kölbchen gehalten und verflüssigt, weil man dadurch secundäre Verunreinigung am besten ausschliesst. Man kann aber auch bisweilen Platten oder Rollröhrchen vortheilhaft anwenden.

Diese Verbindung der Plattenmethode mit der Verdünnung in Flüssigkeiten habe ich[1]) vortheilhaft verwendet, um Blutserum in Form der Plattenkulturen bei Körpertemperatur anzuwenden. Das steril aufgefangene oder sterilisirte Blutserum wird auf 37° erwärmt. Inzwischen ist eine in flachen Kölbchen gehaltene 2% Agar-Agargallerte, welche aus reinem Agar oder aus Agar mit Zusätzen von Pepton, Zucker etc. besteht, aufgekocht und bis auf 42° abgekühlt worden. Das Blutserum wird nun geimpft, die Keime werden zum Verhüten der Blasen- und Schaumbildung durch vorsichtiges Hin- und Herbewegen möglichst genau vertheilt und dann wird das inficirte, 37° warme Blutserum zu dem flüssigen 42° warmen Agar hinzugegossen. Darauf wird in der Mischung des keimhaltigen Blutserums und des keimfreien Agar nochmals durch Hin- und Herbewegen für eine gleichmässige Vertheilung der Keime gesorgt und dann lässt man die Masse ruhig erstarren. War das Ausgangsmaterial sehr keimreich, so muss man mit Blutserum ein Originalglas und von diesem mehrere Verdünnungen anlegen und mit jeder derselben ein Agarkölbchen versehen.

Vor einigen Jahren standen sich die Methoden mit gelatinirenden Medien und die Verdünnungsmethode mit Flüssigkeiten so feindlich gegenüber, dass eine Verständigung ganz unmöglich schien. Jetzt sind so viele Verbindungsmöglichkeiten dieser Methoden verwirklicht, dass man ernstlich kaum noch von unverstandenen und unversöhnlichen Gegensätzen der Pasteur-Naegeli'schen und der Schröter-Koch'schen Methodik reden kann und nur der Uebereifer einiger Anhänger der einzelnen Richtungen versucht noch gelegentlich einmal die glücklich überwundenen Gegensätze aufleben zu lassen. Die

[1]) Centralblatt für Bakteriologie 1887, I, No. 20.

Pasteur'sche und Naegeli'sche Schule mussten die eigenthümlichen Vorzüge der gelatinirenden Medien für die bequeme Trennung der Keime und die Vorzüge der festen Nährböden für die schnelle Erkennung der Arten sich zu eigen machen und die Koch'sche Schule musste sich mit der älteren Verdünnungsmethode und ihrem universellen Prinzip so abfinden, dass ihre beste Methode selbst zu einer Verdünnungsmethode wurde.

---

12. Luftbeschränkung und Luftabschluss; Hydrobiose, Aërobiose, Anaërobiose

Bei den bis jetzt betrachteten Methoden für Massen- und Reinkulturen war keine Rücksicht darauf genommen worden, dass das Sauerstoffbedürfniss der verschiedenen Mikrobien ein sehr verschiedenes ist. Einige leben bei reichlichem Luftzutritt, andere vertragen eine Beschränkung der Luftzufuhr und einzelne können selbst nach vollständigem Verdrängen der Luft leben und das Substrat zerlegen. Gerade umgekehrt übertragen andere Arten sogar Sauerstoff und wirken dadurch oxydirend. Wenn man von den häufigsten Fällen des gewöhnlichen Saprophytismus ausgeht, kann man, in Ergänzung der Angaben und der Terminologie von Pasteur, in Bezug auf das Sauerstoffbedürfniss einige Gruppen unter den Mikroorganismen auseinander halten, wie es zuerst von mir[1]) und später von Liborius[2]) geschehen ist.

facultative Aërobiose
/ \
strenge Aërobiose facultative Anaërobiose
| |
Oxydationsgährungen obligate Anaërobiose.

---

[1]) Deutsche med. Wochenschrift 1884, No. 48; Methoden, 1. Aufl., 1885, S. 3.
[2]) Zeitschrift f. Hygiene 1886, I, S. 115.

Bei den gewöhnlichen Methoden tritt Luft durch die Watteverschlüsse zu und man sieht schon bei diesen Methoden, dass manche Bakterien sich mit Vorliebe an der Oberfläche der Gelatine oder der Flüssigkeiten entwickeln, wo die Luft frei zutreten kann, während andere im Innern der Gelatine besser wachsen, wo Sauerstoffbeschränkung besteht. In Flüssigkeiten sieht man bisweilen, dass manche Arten sich im Innern derselben vermehren, ehe es zu einer Deckenbildung kommt; dieses Verhältniss kann man auch als Hydrobiose bezeichnen. Auch hierbei besteht vielleicht schon eine Beschränkung des Sauerstoffs, da derselbe wohl von der Flüssigkeit absorbirt werden könnte, während in Wirklichkeit die in den oberen Schichten der Flüssigkeit lebenden Bakterien den Sauerstoff verbrauchen und denselben deshalb gar nicht in die Tiefe der Flüssigkeit eindringen lassen. Dies ist besonders von Duclaux hervorgehoben worden, um die Hydrobiose von vornherein als eine Form der Anaërobiose anzusprechen. Vielfach steht es aber in derartigen Fällen so, dass die Hydrobiose von beweglichen Bakterien ausgeübt wird, welche in die oberen Flüssigkeitsschichten emporsteigen, sich dort mit Sauerstoff beladen, also das spätere Leben in der Flüssigkeit mit Luftsauerstoff vollziehen können. Auf jeden Fall ist die reine Hydrobiose, besonders bei beweglichen Arten, kein zwingender Beweis für die Luftabwesenheit im Innern der Flüssigkeit. Wohl aber ist dies in der Regel der Fall, wenn sich Bakterien- oder Pilzhäutchen auf der Flüssigkeit bilden. Nach Pasteur verbrauchen diese sicher den Luftsauerstoff an der Oberfläche und verhindern seine Diffusion in die darunter befindliche Flüssigkeit, so dass im Innern derselben lebende Bakterien dies ohne Luftsauerstoff thun müssen.

Um über die causalen Beziehungen der Hydrobiose klar zu werden, muss man auch das Umgekehrte der Anaërobiose in Betracht ziehen und Versuche mit längerem Durchleiten von Luft anstellen. Die Kölbchen oder Reagirgläser, Fig. 43 R, werden mit einem luftdichtschliessenden doppeltdurchbohrten Gummipfropf G versehen, in dessen einer Durchbohrung ein rechtwinkelig gebogenes, bis auf den Boden der Flüssigkeit reichendes Glasrohr L steckt, welches zum Filtriren der Luft mit einem Watteverschluss versehen ist. Das

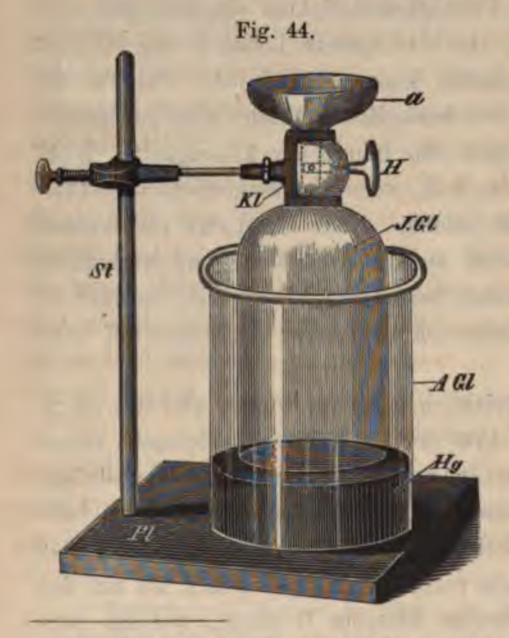
andere, unter dem Pfropf endigende Glasrohr As wird mit einem Aspirator oder mit der Wasserstrahlpumpe verbunden und durch Aspiriren an demselben dauernd Luft durchgesaugt, welche von o aus durch die Flüssigkeit g in Blasen aufsteigt, deren Geschwindigkeit nach Bedarf regulirt werden muss.

Fig. 43.

Eine **Beschränkung des Luftzutritts**, welche oft schon bis zu völligem Luftabschlusse geht, erreicht man in verschiedener Weise.

Klebs[1]) hat den Apparat Fig. 44 angegeben. In ein äusseres cylindrisches Gefäss A Gl, welches mit einer Schicht Quecksilber Hg versehen wird, taucht eine unten offene Glocke I Gl bei geöffnetem Hahn H ein. Nach Schliessen des Hahnes H kann man die innere Glocke beliebig hoch heben und in der gewünschten Stellung durch die am Stativ St festzustellende Klammer Kl befestigen. Man kann durch verschieden tiefes Einsenken oder Hochheben der inneren Glocke den Druck und die Sauerstoffspannung in derselben verändern. Die zu prüfenden Objecte werden auf einen im Quecksilber stehenden eisernen Untersatz gestellt. Der trichterförmige Aufsatz a dient, unter entsprechendem Oeffnen des Hahnes H, zur Regulirung des Luftdruckes im Innern der Glocke oder zur Erneuerung der Innenluft oder auch zur Entnahme von Luftproben.

Fig. 44.



1) Die allgemeine Pathologie 1887, S. 104.

Eine starke Beschränkung der Luft findet auch in dicken Gelatineschichten statt, wobei die Autoxydation der Gelatine wesentlich unterstützend wirken dürfte. Man sieht dies schon bei Strichkulturen. Besser ist es aber, das Material nach Hesse[1]) auf den Grund des Glases zu bringen und verflüssigte Gelatine aufzugiessen, welche nach dem Erstarren den in der Tiefe befindlichen Gegenstand abschliesst. Man kann auch eine gewöhnliche Strichkultur in fester Gelatine anlegen oder eine in verflüssigter Gelatine verdünnte Mischung erstarren lassen und giesst dann eine Schicht Gelatine oder Oel O, Fig. 45, auf, so dass die Kolonien g in der erstarrten unteren Gelatineschicht ohne Luftzutritt sich entwickeln müssen. Agar-Agar kann in ganz derselben Weise behandelt werden und seine Eigenschaft, bisweilen in gährfähigen Zucker überzugehen, kann dabei gelegentlich vortheilhaft zur Geltung kommen.

Fig. 45.



Nach Koch[2]) kann man zum Luftabschlusse auf die Gelatine- oder Agar-Agarplatten, wenn die Gelatine eben zu erstarren beginnt, ein dünnes Blatt von Marienglas oder Glimmer auflegen, welches mindestens ein Drittel der Gelatineoberfläche in der Mitte bedeckt. „Das Glimmerblatt legt sich wegen seiner Elasticität vollständig der Gelatinefläche an und sperrt also an der bedeckten Stelle die Luft ab.“ Anaërobiotische Bakterien wachsen auch unter der Glimmerplatte zu Kolonien aus, während exquisit aërobiotische unter der Platte nur etwa 2 mm weit gut wachsen, „bis wohin noch eine Diffusion der Luft dringen kann.“ Von den aërobiotischen Bakterien bilden sich unter der Glimmerplatte nur „ganz ausserordentlich kleine, dem blossen Auge nicht sichtbare Kolonien, die wahrscheinlich von dem noch in der Gelatine enthaltenen Sauerstoff ihr Leben gefristet haben, die sich aber nachher nicht weiter vergrössern.“

Nach Esmarch erzielt man eine fast vollständige Verdrängung der Luft, wenn man den Hohlraum von fertig gemachten Rollröhrchen mit flüssiger Gelatine ausfüllt. Da die dünnen Gelatineschichten der

---

1) Deutsche med. Wochenschrift 1885, No. 14.

2) Berliner klin. Wochenschrift 1884, No. 31.

Rollröhrchen gegen Temperaturerhöhungen sehr empfindlich sind, müssen dieselben in Eiwasser gestellt werden, während die verflüssigte Gelatine eingegossen wird. Nach dem Erstarren sind die in der Wandschicht fixirten Keime von der Luft fast vollständig abgeschlossen. Dies geschieht auch, wenn man die Rollröhrchen nach Schill so anlegt, dass man die verflüssigte Gelatine zwischen dem gelatinehaltigen Röhrchen und einem eingeführten engen Reagirglase ausrollt.

H. Buchner[1]) bringt in ein grösseres äusseres reagirglasähnliches Gefäss alkalisches Pyrogallol, welches, nach Verschluss des Gefässes mit einem luftdicht schliessenden Gummipfropf, den Sauerstoff absorbirt, so dass in dem Gefässe eine Atmosphäre von Stickstoff mit etwas Kohlensäure und einer Spur Kohlenoxyd bleibt. Auf den Boden dieses äusseren Rohres wird 1 gr trockene, käufliche Pyrogallussäure gebracht und dazu mit Pipette 10 ccm einer $^1/_{10}$ Kalilauge (1 Theil Liquor Kali caust. zu 10 Wasser) gegeben. Nun wird sofort das zu prüfende, entsprechend kleinere Reagirglas mit Bouillon oder seiner Gelatine- oder Agar-Stichkultur oder Rollschicht auf ein kleines Drahtgestell im Innern des grösseren Gefässes gestellt, sein Wattepfropf etwas gelockert und das äussere Gefäss mit Gummipfropf luftdicht verschlossen. Ich verwende als äusseres Gefäss grössere cylindrische Gläser, deren eingeschliffener Glasstopfen nach Beschicken noch mit Paraffin abgedichtet wird. Auf den Boden dieses Gefässes kommt eine entsprechend grössere Menge Pyrogallol. Im Innern befindet sich ein Dreieck mit Drahtnetz, auf welches eine grössere Zahl Reagirgläser gestellt werden kann. Bei Bouillon und Agar kann das Ganze der Brüttemperatur ausgesetzt werden.

Der Beginn der Entwicklung kann sich bei dieser Versuchsanordnung mit dem Anfangs vorhandenen Sauerstoffe vollziehen, da die Absorption desselben durch Pyrogallol bis zu 24 Stunden in Anspruch nimmt. Um dies etwas zu mildern, kann man das Gefäss nach Beschickung mit den geimpften Röhrchen die ersten 24 Stunden kalt stehen lassen; in dieser Zeit erfolgt keine Entwickelung, wohl

[1]) Centralblatt für Bakteriologie 1888, Bd. IV, No. 5.

aber Absorption des Sauerstoffs, so dass von da ab die Entwicklung anaërob ist, wenn man nunmehr zur geeigneten höheren Temperatur übergeht.

Eine sehr bequeme Methode für starke Beschränkung bis zum vollständigen Ausschlusse der Luft ist die von mir[1]) eingeführte Kultur in Eiern.

Die frischen Eier werden äusserlich sorgfältig gereinigt, darauf wird die Schale mit Sublimatlösung sterilisirt und mit sterilisirtem Wasser abgespült und dann werden die Eier mit steriler Watte abgetrocknet. Nach dieser Vorbereitung wird an der Spitze des Eies mit geglühtem Instrumente eine feine Oeffnung gemacht und durch diese hindurch mit Platindraht, Platinöse oder Glaskapillare die Infection des Eies bewirkt. Hierauf wird die Oeffnung mit einem kleinen Stücke eines feinen sterilisirten Papiers bedeckt und das Ganze mit einem Collodiumhäutchen dicht geschlossen. Auch im Innern des Eies befindet sich in Folge des Oeffnens und der Diffusion durch die Schale etwas Sauerstoff, welcher bei dem Auskeimen der eingeimpften Keime in Frage kommen kann. Sobald sich aber in Folge des Wachsthums reducirende Gase z. B. Schwefelwasserstoff bilden, herrscht im Innern des Eies vollständig Anaërobiose. Gegenüber allen andern Methoden ist hier ein wichtiges, bis jetzt sehr wenig beachtetes Moment berücksichtigt, insofern sich die Entwicklung im Ei auf Kosten eines ganz unveränderten Substrates vollzieht.

Für anaërobiotische Gährungen kann man das Material, wie bei den Massenkulturen, oft vortheilhaft vorbereiten. So erhielt Kitasato[2]) Reinkulturen der Tetanusbacillen, indem er das sporenhaltige Material ca. 1 Stunde auf 80° erwärmte und dann erst die Anaërobiose (Durchleiten von Wasserstoff) ausführte. Kitt[3]) verdünnte den Eiter mit sterilisirtem Wasser und machte dann Impfstriche (also ähnlich wie Löffler und Schütz bei Rotz) auf Serum und brachte dann die Kulturen unter Anaërobiose (Buchner'sche Methode).

---

[1]) ibid. 1888, Bd. IV, No. 3.
[2]) Zeitschrift für Hygiene 1889, VII, S. 225.
[3]) Centralblatt für Bakteriologie 1890, VII, No. 10.

Vollständiger Ausschluss der Luft kann in verschiedener Weise erzielt werden: 1. kann die Luft durch andere Gase verdrängt und ersetzt werden; 2. kann man durch Kochen der Füssigkeiten Wasserdampf entwickeln, welcher beim Ausströmen die Luft austreibt; 3. kann man die Luft durch die Luftpumpe entfernen.

Die Prüfung auf Abwesenheit von Sauerstoff kann mit alkalischer Pyrogallolösung erfolgen, weil diese klare, gelbbräunliche Lösung durch Sauerstoff sofort dunkel gefärbt wird. Auch Indigotin ist brauchbar. Man versetzt die Controllprobe der alkalischen Bouillon oder Gelatine mit einigen Tropfen der concentrirten wässerigen Lösungen und kocht auf. Hierbei verschwindet die blaue Farbe und kehrt bei Luftabschluss nicht wieder, während sie bei Luftzutritt allmählich wieder erscheint. Nach Gunning ist Ferroferrocyanür noch empfindlicher und es bleibt bei Abwesenheit von Luft weiss, während es sich bei Luftzutritt sofort bläut.

I. Verdrängen der Luft durch Gase. Die zum Verdrängen der Luft bestimmten Gase werden in einem Kipp'schen Apparate entwickelt. Kohlensäure ist für die meisten Bakterien direct schädlich, so dass man ein anderes indifferentes Gas wählen muss. Nach den bisherigen Beobachtungen scheint Wasserstoff dies bis zu einem hohen Grade zu leisten. Das aus käuflichem Zink und verdünnter Schwefelsäure erhaltene Gas muss erst eine Waschflasche mit alkalischer Bleilösung passiren zur Absorption etwaiger Spuren von Schwefelwasserstoff, dann eine Waschflasche mit Silbernitrat zur Absorption von Arsen und schliesslich eine Flasche mit alkalischem Pyrogallol zur Absorption mitgerissenen Sauerstoffs. Man kann das Gas auch zum Reinigen erst durch verdünnte Jod-Jodkaliumlösung, dann durch verdünnte Natronlauge und schliesslich durch ein mit Paraffinstücken gefülltes Rohr gehen lassen.

Man kann die ganzen Kulturplatten in grosse Glocken mit aufgeschliffenen Deckeln setzen, welche Tuben für Zu- und Ableitung der Luft resp. der Gase haben, in welche luftdicht schliessende Gummipfröpfe eingesetzt werden. In diesen einfach durchbohrten Gummipfropfen stecken Glasröhren, von denen eine mit dem Gasentwicklungsapparate verbunden wird, während die Luft aus der anderen entweicht. Nachdem die Luft durch Gas ersetzt ist, wird erst die

zum Entweichen der Luft bestimmte Röhre an der Flamme zugeschmolzen und darauf die Gas zuführende Röhre.

Bequemer ist das Ueberleiten von Wasserstoff über die im Kölbchen oder Reagirglase befindliche geimpfte Nährlösung. Solche Vorrichtungen sind von Hauser[1]) und Liborius[2]) angegeben. Das Reagirglas trägt etwas über der Flüssigkeit seitlich einen Ansatz, der mit dem Gasentwicklungsapparate verbunden wird. Nach dem Beschicken und Inficiren wird das Glas etwas unterhalb des Wattepfropfs ausgezogen und während noch das Gas übergeleitet wird, an dieser Stelle zugeschmolzen. Dann wird auch der das Gas zuführende Ansatz zugeschmolzen.

Das Ueberleiten von Gasen genügt aber nicht, um die Luft sicher aus Flüssigkeiten zu vertreiben und es ist deshalb mehr zu empfehlen, die Gase durch die Flüssigkeiten durchzuleiten. Dies haben früher schon Exner, dann E. Buchner[3]) und später Roux[4]) und Liborius[5]) gethan. Roux hatte seine Apparate schon 1884 auf der Londoner Ausstellung ausgestellt, dieselben aber erst später in allgemein zugänglicher Weise veröffentlicht. Das Durchleitungsrohr ist seitlich am unteren Ende des Reagirglases eingeschmolzen und läuft diesem parallel nach oben. Liborius hat den Apparat Fig. 46 angegeben. Das Durchleitungsrohr D ist bei d¹ in das Reagirglas A eingeschmolzen und reicht bis auf den Grund desselben. Das Reagirglas wird unter der mit Wattepfropf versehenen Oeffnung bei a etwas ausgezogen, mit der Trichterröhre Tr gefüllt, sterilisirt und dann

Fig. 46.



1) Ueber Fäulnissbakterien 1885.
2) Zeitschrift für Hygiene, 1886, Bd. I, S. 115.
3) Zeitschrift für physiologische Chemie 1885, IX, S. 380.
4) Annales de l'Institut Pasteur 1887, Bd. I, S. 58.
5) Zeitschrift für Hygiene 1886, Bd. I, S. 127.

inficirt. Nach dem Inficiren verengt man die Stelle a noch etwas stärker und leitet darauf den Wasserstoff von gl aus durch die Flüssigkeit; der Wasserstoff durchsetzt von o aus die Flüssigkeit und reisst die Luft mit. Nach ca. 10 Minuten ist die Luft verdrängt; die Gelatine muss während des Durchleitens in einem Wasserbade bei ca. 30—35° flüssig gehalten werden. Nach erfolgtem Austreiben der Luft wird, während noch Wasserstoff durchgeleitet wird, zuerst das Reagirglas bei a und dann erst das Zuleitungsrohr bei d^2 zugeschmolzen.

So sicher und bequem dieses Verfahren auch ist, so leidet es doch an dem Uebelstande, dass die Durchleitungsröhren zu theuer sind und dass man es nicht gut auf grössere Kolben anwenden kann, wie man sie zu Stoffwechseluntersuchungen gebraucht. Ich[1]) habe deshalb das Prinzip in folgender Form, Fig. 47, angewendet. Auf den Kolben K oder das Reagirglas wird ein mit zwei Durchbohrungen versehener Gummipfropf G fest eingepresst. In der einen Durchbohrung steckt ein bis auf den Boden reichendes Glasrohr L, welches das Gas von o aus durch die Flüssigkeit g leitet und bei diesem Durchleiten die Luft austreibt. In deranderen Durchbohrung steckt ein unmittelbar unter dem Gummipfropf endigendes, kürzeres, rechtwinkelig gebogenes Glasrohr a, welches zum Ableiten der Luft dient. Nachdem das Gas lange genug, d. h. nach der Grösse der Reagirgläser und Kolben, 10 bis 20 Minuten durchgeleitet ist, wird das Rohr a in der Nähe der Umbiegung abgeschmolzen, während noch Gas durch die Flüssigkeit geht und dann erst wird das Rohr L zugeschmolzen. Bisweilen ist es angenehm einen Indicator für Veränderungen des Druckes im Innern des Kolbens zu haben. In derartigen Fällen gebe ich dem Ableitungsrohre die Form a und bringe gegen Schluss des Durchleitens einige Tropfen sterilisirtes Quecksilber Hg ein, welches gleichzeitig luftdicht abschliesst; ein Abschmelzen

Fig. 47.



[1]) Journal für Gasbeleuchtung und Wasserversorgung 1887, No. 17.

des Rohres a ist dann nicht nöthig. Bisweilen ist es erforderlich, das Rohr a viel tiefer herabreichen zu lassen und es in ein mit Quecksilber gefülltes Becherglas eintauchen zu lassen. Der Gummipfropf wird beim Einsetzen etwas angefeuchtet, um fester zu schliessen, und an der Verbindungsstelle mit dem Glase und den Röhren wird er sorgfältig mit Paraffin überzogen. Nach einer mündlichen Mittheilung hat sich auch Brieger eines ähnlichen Durchleitungsverfahrens schon seit einiger Zeit bedient.

C. Fränkel[1]) hat später fast genau dasselbe Verfahren angegeben und zwar wohl unabhängig von Brieger und mir, da Brieger das seinige nicht publizirt hat und das meinige durch den Ort der Publication etwas schwerer zugänglich war. Er nimmt zum Verschlusse des Reagirglases einen luftdicht schliessenden, doppelt durchbohrten Gummipfropf, in dessen einer Durchbohrung ein längeres, zur Gaszuleitung dienendes, bis auf den Boden reichendes Rohr steckt, während das Rohr in der anderen Durchbohrung unmittelbar unter dem Gummipfropf endigt. Noch während des Durchleitens des Wasserstoffs wird das kürzere Glasrohr und dann das Zuleitungsrohr abgeschmolzen.

Bei Agar-Agar muss man das Gas schneller durchströmen lassen, weil man bei 40—42° arbeiten muss und diese Temperatur nicht zu lange einwirken soll. Die Gelatine muss bei 30—35° gehalten werden, um gut flüssig zu sein. Bei Verwendung von Kölbchen kann man nach Mischen der Keime eine Plattenkultur am Boden des Kölbchens erhalten. Bei Verwendung von Reagirgläsern rollt man die verflüssigte Gelatine nach dem Mischen und Vertheilen der Keime in einer Schale mit kaltem Wasser oder unter der Wasserleitung aus, während man Agar-Agar in Wasser von 40° ausrollt, welches man durch Zusetzen von kaltem Wasser langsam bis auf 30 bis 35° abkühlt, oder man rollt die Agarröhrchen direkt in der Hand aus.

Wenn man dies auch schon mit den Röhrchen nach Liborius thun kann, so sind doch die Kölbchen und Reagirgläser nach dem von mir, Brieger und C. Fränkel angegebenen Verfahren viel bequemer

---

[1]) Centralblatt für Bakteriologie 1888, Bd. III, No. 23—24.

und billiger und man kann mit dieser sehr bequemen Methode alle Vortheile der Plattenmethode ausnützen.

Ebenso kann man das Einleiten von Wasserstoff verwenden, um Kartoffelscheiben oder feste Substrate, wie Agar und Blutserum, in Reagirgläser für die Anaërobiose zu verwenden, indem man am einfachsten das Glas während des Einleitens nach Löffler und Fuchs[1]) nach unten hält und, nachdem einige Minuten Gas eingeleitet ist, von unten mit einem Gummipfropf fest verschliesst, der nachher noch paraffinirt wird.

Blücher[2]) und Botkin[3]) haben Apparate angegeben, in welchen man Plattenkulturen in einer Wasserstoffatmosphäre kultiviren kann.

II. Das Verdrängen der Luft durch Wasserdampf erfolgt beim Kochen, wobei der durch die Siedetemperatur entwickelte Wasserdampf beim Ausströmen die Luft mitreisst. Da das Kochen aber die Keime zerstört, muss eine Vorkehrung getroffen werden, um die Infection nach erzielter Luftleere vornehmen zu können, ohne dass Luft zutritt und ohne dass die Keime leiden. Ein von Pasteur angegebenes Verfahren wird später erwähnt. Hüfner[4]), Rosenbach[5]) und Liborius l. c. haben hierzu die Infectionsfortsätze angebracht; auch die von Aitken angegebenen Tuben tragen solche Fortsätze. Dicht unter der Stelle, an der später das Reagirglas oder Kölbchen ausgezogen und zugeschmolzen werden soll, befindet sich seitlich ein feines, spitz ausgezogenes Glasrohr, welches in die Infectionsflüssigkeit eingetaucht und mit derselben gefüllt und wieder zugeschmolzen wird. Nach Auskochen der Flüssigkeit wird das Reagirglas oberhalb dieses seitlichen Ansatzes ausgezogen und zugeschmolzen und dann nach dem Abkühlen auf Bluttemperatur durch Neigen der Inhalt des Infectionsfortsatzes in die Flüssigkeit übergeführt. Diese Art, die Flüssigkeit luftleer zu machen und zu in-

---

1) Ein anaërober Eiterungserreger. Dissert. Greifswald 1890. Citirt von Löffler, Centralblatt f. Bakteriologie 1890, VII, No. 20.

2) Zeitschrift für Hygiene 1890, VIII, S. 499.

3) ibid. 1890, IX, S. 383.

4) Journal f. prakt. Chemie, N. F., Bd. XIII.

5) Deutsche Zeitschrift für Chirurgie, Bd. XVI.

ficiren, ist aber so umständlich, dass sie jetzt ganz verlasssen werden kann. Einen Vorzug hat die Methode vor den unter I besprochenen, dass nämlich keine fremden Bestandtheile zugeführt werden. Auch ein so indifferentes Gas wie Wasserstoff ist nicht für alle Bakterien gleich indifferent und bei der Zerlegung der Substrate kann es in statu nascendi gelegentlich auch zur Activirung von Wasserstoff kommen und dies muss öfters sicher ausgeschlossen werden, besonders dann, wenn man die entstehenden Gase untersuchen will. Da viel Wasser verdampft, müssen die Lösungen von vornherein stark verdünnt sein. Nikiforoff[1]) zieht Glasröhren von 1 cm Weite so aus, dass ein Stück von 3—5 cm Länge als Reservoir unberührt bleibt; an einer Seite wird das kapillar ausgezogene Rohr etwa 3—4 cm von dem Reservoir entfernt abgeschmolzen, während an der andern Seite eine Kapillare von ca. 1—2 mm Weite und ca. 25 cm Länge ausgezogen wird. Dieser lange Kapillar-Ansatz wird bei 10 cm Entfernung vom Reservoir umgebogen, so dass man mit ihm in Reagirgläsern bis auf den Boden reichen kann. Das Röhrchen lässt man mit dem offenen langen Ende in ein mit sterilem Wasser gefülltes Reagirglas tauchen und erwärmt dann das Reservoir leicht, so dass beim Wiederabkühlen etwas Wasser in das Reservoir aspirirt wird. Die einzufüllenden Flüssigkeiten sind vorher durch Kochen luftfrei gemacht. Nun erhitzt man das Reservoir bis zum Sieden des Wassers und bis zum fast vollständigen Verdampfen desselben und taucht nunmehr das offene Ende der Kapillare in die luftfreie Nährlösung, welche jetzt durch die Kapillare in das luftverdünnte Reservoir einstürzt. Nachdem so das Röhrchen mit sterilisirter luftfreier Nährlösung gefüllt ist, wird die lange Kapillare an der Umbiegungsstelle abgeschmolzen. Das Impfen geschieht unter Abbrechen dieser Stelle mit Platindraht oder durch Einführen kleiner, mit Impfmaterial vollgesaugter feinster Kapillarröhrchen. Nach der Impfung erhitzt man das kapillare Ende des Kulturgläschens von Neuem und schmilzt wieder zu.

III. Methoden, bei denen die Luft durch die Luftpumpe abgesaugt wird. Zum Absaugen dient eine gute Luftpumpe oder eine Wasserstrahlpumpe oder allenfalls ein einfacher Aspirator.

---

[1]) Zeitschrift für Hygiene 1890, VIII, S. 489.

Von Liborius wurde l. c. S. 128 zu diesem Zwecke ein Apparat angegeben, in den als feuchte Glocke die fertigen Platten eingesetzt werden konnten; doch ist dieses Verfahren jetzt als überholt und viel zu schwierig und unbequem wohl ganz verlassen.

Die älteste, einfachste, nach Fitz[1]) besonders auch zu orientirenden Massenkulturen genügende Versuchsanordnung besteht darin, dass man ein Kölbchen, a in Fig. 48, mit langem Halse zur Hälfte oder ein Reagirglas zu einem Drittel mit dem noch unreinen, auf Anwesenheit von anaërobiotischen Organismen zu prüfenden Bakteriengemische oder mit der sterilisirten und mit der Reinkultur geimpften Lösung füllt. Dann zieht man den Hals bei b an der Gaslampe eng aus und verbindet das offene Ende c mit der Luftpumpe. Während des Verdünnens der Luft kommt das Kölbchen a in ein Wasserbad von circa 37°, in dem es unter heftigem Sieden circa $^1/_2$ Stunde bleibt. Dann wird während des Absaugens der Luft der Hals bei b mit einer spitzen Flamme zugeschmolzen.

Fig. 48.

Man erhält auf diese Weise ganz luftleere Wasserhammer, welche kräftig an die Wand anschlagen und in denen nach dem Abkühlen die Flüssigkeit durch Körperwärme, z. B. durch Halten in der Hand, zum Sieden kommt. Diese Versuchsanordnung ist von Pasteur eingeführt und früher auch von Cohn, Lister, Tyndall, Aitken, Fitz vielfach erprobt worden.

Nach Nencki[2]) kann man in folgender Weise verfahren, Fig. 49. Das Gefäss wird bis zur Höhe a mit dem Bakteriengemische oder der geimpften Lösung gefüllt und darauf mit dem doppelt durchbohrten Kautschukpfropf verschlossen. Durch die eine Oeffnung dieses Pfropfs geht ein Glasstab b, welcher in einem eingeschliffenen Stöpsel endet, der gut in die Verjüngung c passt, so dass der Inhalt der Kugel A von der oberen Flüssigkeit vollständig abgeschlossen werden kann. In der zweiten Oeffnung befindet sich das rechtwinkelig gebogene Rohr d, dessen Ende mit der Luftpumpe verbunden wird.

---

[1]) Ueber Spaltpilzgährungen IX. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, XVII. Bd., 1884, S. 1188.

[2]) Beiträge zur Biologie der Spaltpilze 1880.

Wähend des Saugens befindet sich die Kugel A im Wasserbade und der Glasstab b wird so weit herausgezogen, dass der Stöpsel sich ungefähr bei a befindet. „Sobald die Luft entfernt ist, was man an dem stossweisen Aufkochen und Anschlagen der Flüssigkeit an die Wände des Gefässes erkennt, wird durch vorsichtiges Drehen der Glasstab hinuntergedrückt, bis durch den Stöpsel die in der Kugel A befindliche Flüssigkeit hermetisch abgeschlossen ist. Sodann wird während des Aspirirens mittelst einer spitzen Flamme bei d das Rohr zugeschmolzen und nach dem Erkalten das zugeschmolzene Ende in einer concentrirten, soeben bereiteten alkalischen Pyrogallollösung abgebrochen. Nachdem hinreichend, bis etwa zu der Höhe n Pyrogallollösung eingetreten ist, wurde das Rohr d von Neuem zugeschmolzen."

Fig. 49.

Fig. 50.



Diese Methode kann wohl die Möglichkeit der Anaërobiose zeigen, aber als Methode der Reinkultur bei Luftabschluss kann man sie nicht gelten lassen. Dies leistet aber das von M. Gruber[1]) angegebene Verfahren vollständig. Man nimmt entweder längere Reagirgläser oder schmilzt ca. 22—25 cm lange Stücke eines leicht schmelzbaren, starken Glasrohres an einem Ende zu. Diese Gläser, Fig. 50, werden in üblicher Weise gereinigt, getrocknet und dann an einer Stelle a derart verengt, dass der untere Abschnitt etwa 15, der obere offene circa 5—6 cm lang ist; dann werden die Gläser in gewöhnlicher Weise mit einem Wattepfropf versehen und steri-

[1]) Centralblatt für Bakteriologie 1887, I, No. 12.

lisirt. Mit Hülfe eines Trichters füllt man circa 10 ccm Nährlösung ein, wobei die verengte Stelle a trocken bleiben muss und sterilisirt nochmals. Da beim Evacuiren die Lösung eingedickt wird, so fügt man auf 10 cm der gewünschten Lösung noch 2 ccm sterilisirtes Wasser hinzu.

Nach dieser Vorbereitung werden die Nährlösungen in der gewöhnlichen Weise inficirt, dann wird der Wattepfropf wieder aufgesetzt und derselbe nunmehr, so wie es die Figur zeigt, tief in den Hals des Glases hineingestossen. Darauf wird ein vorher ausprobirter, luftdicht schliessender Gummipfropf g fest eingesetzt, der eine Durchbohrung hat, in der ein rechtwinklig gebogenes, kurzes Glasrohr Lp steckt. In der Regel ist ein besonderes Abdichten nicht erforderlich; wird es gewünscht, so dichtet man mit Paraffin. Das Glasrohr wird bei Lp durch ein Verbindungsstück aus Gummi mit der Luftpumpe verbunden. Das Evacuiren geschieht während das mit Nährlösung beschickte Ende des Glases R in ein Wasserbad von 30—35°, bei Agar von 40—42°, taucht. Bei dieser Temperatur ist die Lösung in ca. 10—15 Minuten luftleer. Um bei dem heftigen Sieden und Aufschäumen der Flüssigkeit ein Benetzen des ausgezogenen Theiles zu vermeiden, kann man das Rohr dicht unterhalb dieser Stelle durch Befächeln mit einer Bunsenflamme leicht erwärmen. Während des Evacuirens wird dann bei a zugeschmolzen.

Das zugeschmolzene Röhrchen muss man bei Agar in Wasser von 40° bringen, welches man zum Ausrollen und Erstarren des Agar unter stetem Rollen des Röhrchens langsam bis auf 35° abkühlt. Bei Gelatine muss man das Röhrchen unter Drehen in der Hand langsam an der Luft abkühlen lassen, damit sich das Vacuum für die Zimmertemperatur mit Wasserdampf sättigt; dann wird das Erstarren der Rollschicht in kaltem Wasser beendigt. Bei Kulturen in Flüssigkeit ist nach dem Zuschmelzen keine weitere Behandlung nöthig.

In ähnlicher Weise lassen sich auch Kartoffelscheiben behandeln. Nach Roux[1]) kann man nach Impfen der sterilisirten Kar-

---

[1]) Annales de l'Institut Pasteur 1888, Bd. II, S. 28.

toffel k in Fig. 27, S. 271 das Reagirglas unter dem Wattepfropf w bei h ausziehen und zuschmelzen. Die Röhrchen hatten vorher entweder bei a oder b einen Glasansatz erhalten, den man mit der Luftpumpe verbindet und nach dem Evacuiren an der Flamme abschmilzt. In meinem Laboratorium ziehen wir es vor, das Evacuiren ähnlich wie bei dem Gruber'schen Verfahren vorzunehmen. Nach dem Impfen der Kartoffelscheibe wird der Wattepfropf w so weit in das Glas hinabgedrückt, dass man einen Gummipfropf wie g bei dem Gruber'schen Verfahren, Fig. 50, aufsetzen kann. Der Vorsicht halber evacuiren wir bei Kartoffelscheiben ca. 20 Minuten, dann wird während des Evacuirens der äussere Schenkel des vorstehenden Glasröhrchens Lp an der Knickung zugeschmolzen. Das fertige Röhrchen unterscheidet sich von dem Gruber'schen dadurch, dass es den Gummipfropf mit dem vorstehenden, abgeschmolzenen Glasröhrchen trägt, während bei Gelatine und Flüssigkeiten dieser obere Theil nach dem Zuschmelzen bei a, Fig. 50, wegfällt. Bei Kartoffelkulturen in dieser Weise kann man dasselbe Reagirglas öfters benutzen, bedarf aber zu jedem Glase einen besonderen Gummipfropf; bei Flüssigkeiten bedarf man nach Gruber für jeden Versuch eines besonderen Glases, kann aber den Gummipfropf für viele Gläser hintereinander verwenden. Schottelius[1]) hat für Kartoffeln grössere Fläschchen angegeben, deren zum Einbringen der Kartoffeln und zum Inficiren dienende Oeffnung durch eine luftdicht aufgeschliffene Glaskappe verschlossen werden kann. Das Evacuiren erfolgt durch einen seitlich angeschmolzenen Ansatz.

Fig. 51.



Statt der Reagirgläser kann man auch flache parallelwandige Gefässe, Fig. 51, anwenden. Dieselben werden geimpft, dann wird der Wattepfropf w bis zu einer vorher verengten Stelle in den Hals eingestossen und das Ende h mit der Luftpumpe in Verbindung ge-

[1]) Centralblatt für Bakteriologie 1887, Bd. II, No. 4.

setzt. Nach dem Evacuiren wird oberhalb der Watte bei h zugeschmolzen und dann wird nach dem Mischen und Vertheilen der Keime die gelatinirende Flüssigkeit F durch Flachlegen des Gefässes am Boden als Plattenkultur zum Erstarren gebracht. Besonders für Agar scheint mir dies oft recht empfehlenswerth, weil die Rollröhrchen mit Agar manchmal recht unangenehm sind.

Eine Verbindung des Ueberleitens von Gasen mit dem Evacuiren ermöglicht der von Pasteur, Joubert und Chamberland verwendete Apparat, Fig. 52. Die Schenkel S_1 und S_2 werden durch Eintauchen der Kapillaren-Ansätze a_1 und a_2 in die zu prüfende Flüssigkeit gefüllt und darauf wieder zugeschmolzen. Der Apparat wird dann durch das Gummirohr g luftdicht mit dem oberen Aufsatze verbunden, dessen Schenkel Lp mit der Luftpumpe, dessen Schenkel G mit dem Gasentwicklungsapparate in Verbindung steht. Durch Evacuiren bei Lp wird, bei geschlossenem Hahn G, Luft abgesaugt und darauf der Hahn Lp geschlossen, so dass im ganzen Apparate Luftverdünnung besteht. In diesen luftverdünnten Raum lässt man durch Oeffnen des Hahnes G Gas einströmen und schliesst darauf diesen Hahn wieder. Nun wird von Neuem evacuirt und darauf wieder Gas zugelassen und durch dieses Abwechseln wird die Luft vollständig aus der Flüssigkeit verdrängt. Sobald die Flüssigkeit luftleer ist, wird bei H abgeschmolzen.

Fig. 52.



Die Methode von Gruber scheint mir bis jetzt die einfachste und meisten Vorzüge in sich vereinigende zu sein. Sie ist absolut sicher und führt keinerlei Nebenmomente ein, so dass sie nicht nur zur Trennung anaërobiotischer Keime, sondern auch zum Erkennen verschiedener biologischer Eigenthümlichkeiten geeignet ist. Die

vereinfachte Durchleitung von Gasen nach mir und Fränkel ist vielleicht noch etwas einfacher und zur Trennung der Keime meist ebenso sicher, aber sie hat den oft grossen Nachtheil, dass das eingeführte Gas nicht sicher und für alle Arten indifferent ist, dass es zu secundären chemischen Umsetzungen führen und dadurch stören kann und dass es über Gasbildung nicht urtheilen lässt. Beide Methoden gestatten, die Vortheile der gelatinirenden Medien für die Trennung der Keime auszunutzen und werden dadurch zu allgemein verwerthbaren expeditiven Methoden über Anaërobiose. Gerade bei Anaërobiose haben aber die Flüssigkeiten so viele Vorzüge für das Wachsthum der Bakterien, dass man wohl öfters auch die Verdünnung in Flüssigkeiten vorausschicken wird und die Volumeinheiten mit je einem Keime direct in Flüssigkeiten impft. Für diese Fälle sind die ältere Pasteur'sche Anordnung, Fig. 48, das Gruber-sche Röhrchen, Fig. 50, und, wenn Gase nicht stören, die Durchleitung von Wasserstoff nach mir und Fränkel, Fig. 47, gleich bequem.

Bis jetzt wurde keine besondere Rücksicht auf das Entweichen und Auffangen der Gase genommen. Man kann dies einfach erreichen, wenn man die Spitzen der zugeschmolzenen Röhrchen unter Quecksilber abbricht.

Um eine schnelle Orientirung über Gasbildung bei Luftabschluss zu erreichen, empfehlen Miquel[1]) und Th. Smith[2]) die bekannten Gährkölbchen für die Zuckerbestimmung im Harn.

Pasteur[3]) versuchte dies auf folgende Weise zu erreichen; Fig. 53 und Fig. 54. Ein Kolben von der Form der Fig. 53 wird mit der Lösung gefüllt, das Ableitungsrohr taucht in eine mit derselben Lösung gefüllte Porzellanschale. Die Flüssigkeit im Kolben und die der Porzellanschale werden gleichzeitig etwa eine halbe Stunde gekocht, um alle Luft resp. den Luftsauerstoff aus der Flüssigkeit zu vertreiben. Durch den sich entwickelnden Dampf wird die

---

1) Annuaire de l'observatoire de Montsouris pour l'an 1889, S. 485.

2) Centralblatt für Bakteriologie 1890, VII, No. 16.

3) Études sur la bière 1876, S. 229 ff. Des rapports de l'oxygène avec la levure.

Flüssigkeit aus dem Ballon herausgetrieben, aber es steigt dann wieder durch Kochen luftleer gemachte Flüssigkeit aus der Porzellanschale in den Kolben zurück; dies wiederholt sich während der Dauer des Kochens einige Mal. Dann lässt man abkühlen. Während des Abkühlens habe ich es vortheilhaft gefunden, die Flüssigkeit in der Porzellanschale mit einer Schicht von vorher sterilisirtem Oel zu bedecken, um eine nachträgliche Absorption von Sauerstoff möglichst zu verhindern. Nach vollständigem Abkühlen bringt man das Ab-

Fig. 53.



leitungsrohr zum Auffangen sich bildender Gase unter sterilisirtes Quecksilber und stellt den ganzen Apparat in den Brütofen. Zur Controlle wendet Pasteur Kolben an, Fig. 54, von der doppelten Grösse, welche nur zur Hälfte gefüllt werden, so dass reichlich Sauerstoff zu Gebote steht. Zum Impfen des Kolbens, Fig. 53, kann man sich der früheren Methoden nicht bedienen. Man bringt deshalb in frischer Gährung befindliche Lösung in den Ansatz über dem Glashahn, der vorzüglich schliessen muss. Nach dem Abkühlen lässt man unter schnellem Oeffnen und Wiederschliessen des Hahns einige Tropfen der in der Gährung befindlichen Lösung in den Kolben übertreten. Statt einer in Gährung befindlichen Lösung kann

man auch eine Suspension der Reinkulturen in sterilisirtem, luftfreiem, destillirtem Wasser in den kleinen Recipienten bringen.

Um den Stoffwechselproducten der Bakterien das Entweichen zu gestatten und jeden Kautschukverschluss zu vermeiden, wählte Nencki l. c. folgende Anordnung, Fig. 55.

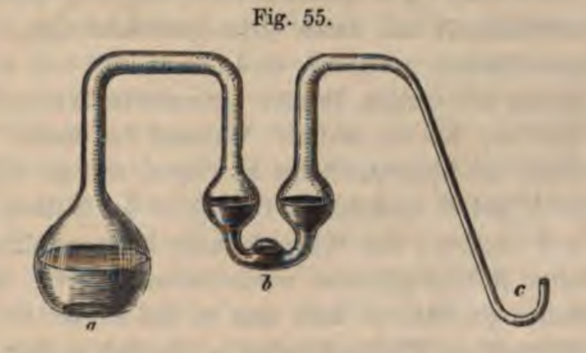
Fig. 54.



Das an 3 bis 4 Stellen verjüngt ausgezogene Ableitungsrohr c taucht in die auf Anwesenheit anaërobiotischer Mikroorganismen zu prüfende oder mit Reinkulturen geimpfte, sterilisirte Flüssigkeit, während gleichzeitig der Liter-Kolben a durch Erwärmen luftleer gemacht wird. In Folge dessen wird die Flüssigkeit in den Apparat aspirirt, der etwa zu $^2/_3$ des Kolbens a gefüllt wird.

Darauf wird das Ende von c mit der Luftpumpe verbunden und während der Kolben a im Wasserbade sich befindet, der ganze Apparat wie früher (Text zu Fig. 48 und 49) luftleer gemacht. Während des Saugens wird das Rohr c an einer Verjüngung zugeschmolzen.

Fig. 55.



Das zugeschmolzene Ende wird darauf in reinem Kohlensäure- oder Stickstoffgas abgebrochen und dadurch der Apparat mit diesem Gase gefüllt und das Ende c von Neuem zugeschmolzen. Das zugeschmol-

zene Ende wird dann wiederum in alkalischer, concentrirter Pyrogallollösung abgebrochen, durch Erwärmen des Apparats ein Theil des Gases herausgetrieben, bis die beiden Kugeln des U-förmigen Rohres b etwa zur Hälfte mit der Pyrogallollösung gefüllt sind. Dann lässt man das Ende von c in Quecksilber tauchen und bringt den ganzen Apparat in einen Thermostaten.

Gunning[1]) hatte den älteren Versuchsanordnungen gegenüber geltend gemacht, dass die gebräuchlichen Abschlüsse gegen die Luft, wie Glashähne, Quecksilber, Pyrogallollösung, keine volle Sicherheit bieten, da er durch das nach seiner Ansicht empfindlichste Reagens auf Sauerstoff, das weisse Ferroferrocyanür, die Anwesenheit von Sauerstoff glaubte nachweisen zu können.

Nencki und Lachowicz[2]) wählten deshalb folgende Versuchsanordnung, Fig. 56. Der Apparat besteht aus zwei Kölbchen, A und C, von ca. 250 ccm und einem Kölbchen B von etwa 50 ccm Inhalt.

Das Kölbchen A dient zur Entwicklung von Wasserstoff aus Eisen und Schwefelsäure und zur Bildung von eisenoxydfreiem schwefelsauerem Eisenoxydulsalz; vor Einschmelzen des Trichterröhrchens a werden deshalb mehrere Rollen Klavierdraht in A eingebracht. B dient zur Aufnahme von ca. 10 ccm Blutlaugensalzlösung und zur Entwicklung des weissen Ferroferrocyanür. C enthält die Nährlösung. Die Kolben werden sorgfältig gereinigt oder besser noch sterilisirt und durch Hitze getrocknet und dann bei d zusammengeschmolzen. Darauf wird A zu $^2/_3$ mit destillirtem Wasser gefüllt, mit einigen Tropfen concentrirter Schwefelsäure angesäuert und zum Kochen erhitzt. Während des Siedens ist durch Schrägstellung des Apparates Sorge zu tragen, dass die im Röhrchen d zwischen A und B condensirten Dämpfe in den Kolben A zurückfliessen, weil sonst mit den Wasserdämpfen Eisenoxydultheilchen in das Kölbchen B hineingerissen werden können. „Hat das Wasser einige Minuten gekocht, so lässt man es auf 69 bis 50° erkalten und giesst durch das Trichterröhrchen a von Zeit zu Zeit in kleinen

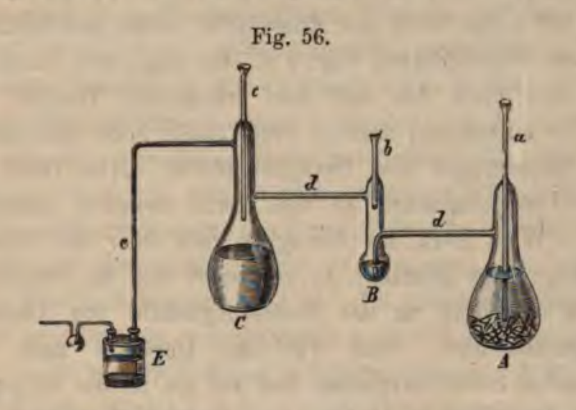
---

[1]) Journal, f. pract. Chemie. N. F., Bd. XX, 1879, S. 434.

[2]) Die Anaërobiosefrage. Archiv f. d. ges. Physiologie, Bd. XXXIII, 1883.

Portionen gut ausgekochte etwa 30 bis 40 %ige Schwefelsäure ein, wodurch ein gleichmässiger, rascher und viele Stunden andauernder Strom von Wasserstoffgas erzeugt wird. Jetzt werden einige frisch auskrystallisirte Krystalle von Ferrocyankalium in ausgekochtem Wasser gelöst und einige Cubikcentimeter davon durch das Trichterröhrchen b in das Kölbchen B hineingegossen. Während Wasserstoff etwa eine Viertelstunde lang durch die Ferrocyankaliumlösung streicht, wird der Kolben C mit der (sterilisirten) Nährlösung zu etwa $^2/_3$ des Inhalts gefüllt und sodann das Kölbchen B bei b zugeschmolzen. Jetzt wird die Flüssigkeit in dem Kolben C 10 bis

Fig. 56.



15 Minuten lang im Sieden erhalten, hierauf die Flamme entfernt und noch, während die Flüssigkeit kocht, das Ableitungsrohr e mittelst des in dem Gefässe E befindlichen Quecksilbers abgesperrt." Das Quecksilber ist mit einer Schicht von alkalischer Pyrogallollösung und diese mit einer Schicht Oel oder anderer in Wasser unlöslichen Flüssigkeit bedeckt. Das Trichterröhrchen c wird nun mit einem Wachspfropf verschlossen, damit das Wasserstoffgas durch den Quecksilberverschluss in E entweicht und so alle Luft aus diesem Theile des Apparates verdrängt. Wenn die Nährlösung in C auf ca. 30° abgekühlt ist, lüftet man den Wachspfropf und inficirt die Nährlösung mit einigen Tropfen des zu prüfenden Bakteriengemischs oder der in sterilisirtem Wasser suspendirten Reinkultur, trocknet den Hals bei c mit Löschpapier und schmilzt zu. Um auch das Röhrchen a mit Wasserstoffgas zu füllen, bringt man in dasselbe

etwas Eisendraht und schmilzt auch dieses Röhrchen bei a zu. Jetzt ist im ganzen Apparate die Luft durch Wasserstoffgas ersetzt. „Auf diese Weise geschieht die ganze Beschickung des Apparates im Wasserstoffstrome und die Entwicklung des Gases dauert noch einige Stunden nachdem alle Eingussröhrchen zugeschmolzen sind. Durch Neigung des Apparates wird dann etwas von der Eisenoxydullösung aus A in B hineingezogen. Der jetzt entstandene Niederschlag von Ferroferrocyanür (Fe_2 [Fe Cy_6]) ist vollkommen weiss und ändert auch nach längerem Stehen seine Farbe nicht."

Zur Anaërobiose im hängenden Tropfen empfiehlt Nikiforoff[1]) den Rand des Ausschliffes eines gewöhnlichen hohlgeschliffenen Objectträgers, Fig. 3 S. 48, rings mit Vaseline zu bestreichen und dann das mit dem hängenden Tropfen versehene Deckglas so aufzulegen, dass an einer Stelle noch eine kleine Lücke zwischen Objectträger und Deckglas bleibt. Hier führt man ein Tröpfchen Pyrogallussäure an den Rand zwischen Ausschliff und Deckglas. Wird jetzt das Deckglas ganz über den Ausschliff in seine richtige Lage gebracht, so verbreitet sich das Tröpfchen Pyrogallussäure als Ring an der Berührungsstelle von Deckglas und Objectträgerausschliff. Nun wird das Deekglas nach der entgegengesetzten Seite verschoben und auf die an der entgegengesetzten Seite entstehenden Lücke ein Tröpfchen Kalilösung gebracht und dann das Deckglas definitiv verschoben und befestigt. Die Tröpfchen mischen sich und die entstandene alkalische Pyrogallollösung absorbirt den Sauerstoff des kleinen Raumes.

Man kann auch die alkalische Pyrogallollösuug auf den Grund des Objectträgers, Fig. 4, oder in den Ring e, Fig. 5, bringen oder sich nach Nikiforoff und E. Braatz[2]) besonderer Objectträger bedienen, von denen die S. 51 ff. angeführten sich eignen, wenn man direct Objecte in Wasserstoffatmosphäre beobachten will.

Nach der allgemeinen Auffassung sind die Bakterienpigmente Oxydationsproducte und erfordern reichlichen Luftzutritt.

---

[1]) Zeitschrift für Hygiene 1890. VIII, S. 489.

[2]) Centralblatt für Bakteriologie 1890, VIII, No. 17.

Esmarch[1]) hatte bei Spirillum rubrum gefunden, dass es sein rothes Pigment nur bei Luftabschluss bildet, was allerdings nicht ganz richtig ist, da diese Art bei mir jetzt auch an der Oberfläche wächst, und Holschewnikoff hat bei mir eine Stäbchenart untersucht, welche gleichfalls nur bei Luftabschluss ein röthliches Pigment bildete. Diese Pigmente sind in der Form, in der sie auftreten, unmittelbare basische Spaltungsproducte der Albuminate, Farbptomaine. Etwas anders verhält sich eine andere Gruppe, welche ich bei der blauen Milch zuerst genauer studirt habe. In diesem speciellen Fall wird zuerst ein farbloses Chromogen gebildet, dasselbe ist eine Farbsäure und verbindet sich mit Ammoniak zu einem grau-blauen Farbsalz, welches in sauerer Lösung schön blau wird. Wenn solche Pigmentbakterien, welche an sich farblose Chromogene als Farbbase oder Farbsäure bilden, die erst durch Verbindung mit einer nebenher für sich entstehenden Säure oder Base gefärbte Farbsalze liefern, die Fähigkeit der Anaërobiose haben, so müssen sich derartige Pigmente bisweilen sowohl bei Luftanwesenheit als bei Luftabschluss bilden. Dies ist z. B. nach Untersuchungen von G. Wood mit dem braunen Pigmente der Cholerabakterien der Fall. In derartigen Fällen wird das durch eine Vereinigung zweier Körper, einer für sich gebildeten Säure mit einer Base zu einem Salze, gebildete Pigment, weil es erst allmählich in dem Maasse, in dem beide Componenten in genügender Menge gebildet werden, entsteht, meist als einfaches Oxydationsproduct gedeutet. Unter diesen Fällen sind solche, bei denen die Abwesenheit von Luft ganz gleichgültig ist, während bei anderen die Anwesenheit von Luft die Bildung des einen Componenten und damit die Farbsalzbildung ermöglicht oder beschleunigt. Am anderen Ende der ganzen Reihe stehen schliesslich sauere und basische Pigmente, welche sich nur bei Luftzutritt bilden. Man findet auf diese Weise bei Pigmentbakterien in ihrem Verhalten zur Luft und dem Luftsauerstoff die ganze Reihe wie auch bei den farblosen Bakterien.

Im Allgemeinen scheinen die Bakterien im Zustande der Anaërobiose etwas empfindlicher gegenüber der Temperatur und dem

---

[1]) Centralblatt für Bakteriologie 1887, I, No. 8.

Nährmaterial zu sein. Man setzt deshalb die anaërobiotischen Kulturen in der Regel der Bluttemperatur aus und giebt ihnen zur Ernährung einen leicht spaltbaren Körper wie Zucker. Es ist dies aber auch nur eine etwas einseitige Deutung nicht genügend ausgedehnter Beobachtungen. Naegeli hatte neben dem Zucker noch dem Pepton eine besondere Rolle in der Ernährung der Organismen bei der Anaërobiose angewiesen. Die Choleraparasiten, welche nach Liborius und mir in peptonhaltiger Gelatine anaërob wachsen können, sollen nach allen anderen Angaben niemals anaërob wachsen, weil sie in zuckerhaltiger Gelatine keine deutlichen Kolonien bilden. Das letztere ist ziemlich genau richtig und doch ist die Sache ganz anders. Nach G. Wood's Versuchen sind die Cholerabakterien im anaëroben Zustande gegen Säuren sehr empfindlich und in der zuckerhaltigen Gelatine häufen sich im festen Zustande die Säuren zu stark an. Wenn man zur flüssigen Gelatine oder Bouillon mit Zucker aber Kalk zusetzt, so wachsen die Cholerabakterien ziemlich üppig trotz der Anaërobiose, weil die entstehende Säure sofort durch den Kalk neutralisirt wird. Das beste Nährmedium für die Cholerabakterien bei Anaërobiose ist aber weder Zucker noch Pepton, sondern steril aufgefangenes Serumeiweiss. Dies Beispiel zeigt, wie vorsichtig man in der Deutung der Befunde sein muss. Bei Aërobiose und Anaërobiose muss man den Bakterien ein adaequates Nährmaterial bieten, welches man durch Versuche ermitteln muss.

Von der oben erwähnten, aber durchaus nicht allgemein gültigen Thatsache ausgehend, dass Zucker die Anaërobiose begünstigt, kamen Kitasato und Weyl[1]) zu der Ansicht, dass, weil Zucker in alkalischer Lösung reducirende Kraft besitzt — was aber nur vom Traubenzucker gilt, während Rohrzucker oft ebenso vortheilhaft ist — vielleicht die Fähigkeit solcher Stoffe, der Luft Sauerstoff zu entziehen und so denselben für die Anaërobiose unschädlich zu machen, in Form von Zusatz zu Agar allgemein verwerthet werden kann. Hierher gehört, wie ich schon in den früheren Auflagen erwähnt habe, auch die Gelatine selbst cf. S. 250. Viele dieser Stoffe, welche in alkalischer Lösung Sauerstoff absorbiren und reduciren,

---

1) Zeitschrift für Hygiene 1890, VIII, S. 41, IX, S. 97.

sind aber mehr oder weniger giftig, wie Hydroxylamin, einige Phenole, Amidophenole, Phenylhydrazin, Chinon, einige Aldehyde. Ameisensaures Natron begünstigt aber in 0,3—0,5 % in Agar das Wachsthum einiger Anaëroben. Von anderen Körpern erwies sich die bereits von M. Traube zur Prüfung auf reducirende Wirkung eingeführte Indigschwefelsäure (cf. S. 257) in Form von indigschwefelsaurem Natron zu 0,1 % am meisten geeignet. Braatz[1]) hat dann ermittelt, dass oft eine stärkere Verdünnung von 1:6—7000 besser ist. Das Indigblau wird soweit zu Indigweiss reducirt, also der Agar entfärbt, als das Wachsthum der Anaërobien reicht, so dass stets ein Stück von 1—2 cm oben blau gefärbt bleibt. Dass umgekehrt der Zusatz von oxydirenden Mitteln die Anaërobien beeinträchtigt, haben Kitasato und Weyl festgestellt durch Zusatz von höchstens 0,5 % chlorsaurem Kalium, 0,1 % jodsaurem Kalium und Natrium und durch 0,05 % chromsaures Natrium, während die Aërobien viel grössere Zusätze solcher Salze vertragen.

Da die Frage der Anaërobiose noch keineswegs nach allen Richtungen hin erledigt ist, kann zum Anhalt über die Richtung der Forschung dienen, dass, während Pasteur, Brefeld, Fitz, Nencki und die meisten Forscher die Anaërobiose als erwiesene Thatsache ansehen, Gunning dieselbe ganz leugnet und als Phantasie bezeichnet, weil immer Spuren von Sauerstoff vorhanden gewesen seien. Es ist bei den Versuchen deshalb in erster Linie erforderlich, dass nicht einfache Hydrobiose oder Luftbeschränkung als Anaërobiose angesehen wird, sondern besondere Versuche ad hoc unternommen werden.

Pasteur, dem das Verdienst der Entdeckung der Anaërobiose zukommt, war von der Voraussetzung ausgegangen, dass jeder Organismus gierig nach Luftsauerstoff sei. Würde ihm dieser entzogen, so nähme er den Sauerstoff aus den gährfähigen Körpern und zerlege diese gerade hierdurch. So entstand bei Pasteur die Ansicht, dass die Anaërobiose die Ursache der Gährung sei. Aber die Voraussetzung dieser Ansicht ist unrichtig oder doch mindestens einseitig. Ein Organismus, welcher gierig nach Luft-

1) Deutsche med. Wochenschrift 1890, No. 46a.

sauerstoff ist, geht meist zu Grunde, wenn ihm dieser Sauerstoff entzogen ist. Doch giebt es auch Organismen und Zellen, welche für gewöhnlich bei Luftzutritt leben und oxydiren, aber auch bei Luftabschluss leben, dann aber das Substrat nicht oxydiren, sondern nur spalten.

Die weitere Consequenz der Pasteur'schen Auffassung über Anaërobiose ist schon von Pasteur selbst gezogen worden. Wenn Organismen bei Luftabschluss leben und spalten, so müssen sie bei Luftzutritt oxydiren, d. h. die Aërobiose müsste die Ursache der Oxydation sein. Auch dies ist z. Th. richtig, oft aber auch ganz falsch, da einzelne Anaërobien bei Luftzutritt nicht oxydiren, sondern absterben. Nach Hoppe-Seyler setzt Luftdurchleiten durch Zuckerlösungen mit gewissen Hefearten die Alkoholmenge beträchtlich herab, doch hat Duclaux für eine andere Hefeart gezeigt, dass bei Luftdurchleiten ebenso reichlich Alkohol gebildet wurde. Bei der Milchsäuregährung habe ich für eine Bakterienart gefunden, dass die Milchsäuremenge, statt bei Luftdurchleiten abzunehmen, im Gegentheil zunimmt. Neben der anaërobiotischen Buttersäuregährung von Pasteur habe ich eine aërobiotische kennen gelehrt und Lindenborn und Holschewnikoff haben gezeigt, dass eine so exquisite Reduction wie die Bildung von Schwefelwasserstoff bei Luftdurchleiten energisch vor sich gehen kann, und ebenso ist es von Heräus für die Reduction von Salpetersäure zu Ammoniak für eine Bakterienart gefunden worden.

Die Chemiker, welche sich bis jetzt mit der Anaërobiose beschäftigt haben, Pasteur, Fitz, Duclaux, Nencki, Hoppe-Seyler, haben ausnahmslos nur die dynamische Seite der Frage berücksichtigt, aber nicht beachtet, dass wir es bei den Fermentorganismen mit einem anpassungsfähigen Protoplasma zu thun haben, welches bei der Anpassung eine Summe von Anpassungsmöglichkeiten repräsentirt, von denen die Anpassung an den Sauerstoff nur eine ist. Diese phylogenetische Seite der Frage habe ich[1]) dann seit dem

[1]) Mittheilungen a. d. K. Gesundheitsamte 1884, Bd. II, S. 345; Deutsche med. Wochenschrift 1884, No. 48; Journal für Gasbeleuchtung und Wasserversorgung 1887, No. 11; Zeitschrift f. d. gesammte Brauwesen 1888. No. 11.

Jahre 1884 mehr und mehr berücksichtigt und als gleich berechtigten Factor neben der dynamischen Seite eingeführt.

Für einige extreme Fälle scheint sich Anaërobiose und Spaltung, Aëration und Oxydation annähernd zu decken, wie denn selbstverständlich die Tendenz jedes Anpassungsvorganges ist, möglichst klare Beziehungen zu schaffen. Aber vollständig erreicht werden diese selten, weil sich die Bedingungen fortwährend ändern und damit die Nothwendigkeit neuer Anpassungen eintritt. Diese Extreme und die zwischen liegenden Fälle, von denen die intensiven Reductionen bei Luftdurchleiten doch wohl in rein dynamischem Sinne geradezu als Fehler der Natur erscheinen, zeigen, dass jedem Protoplasma, jeder Zelle die Fähigkeit der primären Spaltung zukommt und diese Fähigkeit ist ebenso wie die Synthese eine Urfunction jedes Protoplasma und an sich unabhängig von Luftzutritt oder Luftabschluss. Jede Oxydation ist eine secundäre Anpassung und in der verschiedensten Weise gegliedert entwickelt, doch kennen wir das Extrem bis jetzt noch nicht, nach der eine Zelle allein im Stande sein müsste, allen ihr gebotenen Kohlenstoff in Kohlensäure, allen Wasserstoff in Wasser, allen Stickstoff in Salpetersäure zu oxydiren. Auch die weitgehendsten Oxydationen, welche wir an einzelnen Zellen oder Mikroorganismen und selbst an höheren Organismen kennen, sind unvollkommene Athmung. Vollkommene Verbrennung kennen wir nur durch Successionen und Symbiosen von verschiedenartigen Zellen und Organismen. Die vollkommenste Spaltung, welche wir kennen, die von Zucker in Buttersäure, Kohlensäure und Wasserstoff nähert sich dem anderen Extrem bei weitem mehr und die Buttersäure kann durch weitere Spaltung nur noch wenig mehr Wärme liefern. Bei der Buttersäuregährung unter Luftabschluss erscheint der durch Spaltung erreichbare thermische Effect fast vollständig erreicht und meine Untersuchungen über die Spaltung des unzersetzten Eiweiss bei Luftabschluss machen es höchst wahrscheinlich, dass die Ptomaine, Leukomaine, Toxine für die Eiweisskörper eine ähnliche Erschöpfung der Wärmequelle durch Spaltung bezeichnen, wie Alkohol, Buttersäure, Milchsäure etc. für die Kohlehydrate. Diese Endkörper der Spaltung können nur durch Oxydation und Aërobiose noch

mehr Wärme liefern. Der Wasserstoff bei der Spaltung der Kohlehydrate wird bei der Spaltung der Albuminate und ihrer schwefelhaltigen nächsten Derivate ganz allgemein durch Schwefelwasserstoff ersetzt.

Mit dieser wesentlichen Einschränkung und Berichtigung, dass die Spaltung und Gährung im Grunde unabhängig von Luftabschluss und Luftzutritt ist, hat uns die Anaërobioselehre das Verständniss des Zelllebens am tiefsten erschlossen und ich betrachte es als Pasteur's grösstes Verdienst, das er uns als Erster durch die Entdeckung der Anaërobiose, trotz viel zu einseitiger Deutung des Vorganges, das Wesen der primären, intramolecularen Athmung zugänglich gemacht hat.

---

13. Allgemeine biologische Aufgaben und Uebertragungen zum Nachweise der causalen Beziehungen der Bakterienvegetationen zu Zersetzungsvorgängen; Saprophytismus, Fäulniss, Gährung.

In Hinsicht auf die Biologie lassen sich die Bakterien in zwei grosse Gruppen trennen: die Saprophyten, welche sich von todten organischen Körpern nähren, und die Parasiten, welche lebende Organismen befallen.

Unter den Saprophyten scheidet man meist die eigentlichen Fäulnissbakterien von denjenigen, welche eine mehr typische Zersetzung der nicht lebenden organischen Materie bewirken, sodass selbst eine technische Gewinnung der gebildeten Producte ermöglicht wird. Diese letzteren Saprophyten bezeichnet man als Gährungs- oder Fermentbakterien. Ausserdem machen sich unter den Saprophyten noch die Pigmentbakterien besonders bemerkbar.

Viele dieser Saprophyten scheinen, wie schon erwähnt, des Luftsauerstoffs zum Leben und Wirken unter allen Umständen zu

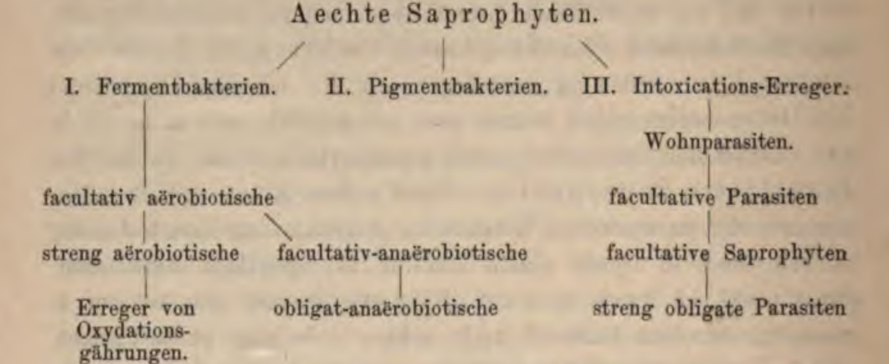
bedürfen: aërobiotische. Manche Arten können denselben zeitweilig entbehren und sollen gerade dann befähigt sein die specifischen Zersetzungen auszuüben, vermehren sich aber und leben auch bei freiem Luftzutritt; man könnte sie facultativ-anaërobiotische nennen. Wieder von anderen Arten ist behauptet worden, dass die Abwesenheit von Luftsauerstoff zu ihrem Leben und Wirken nothwendig sei, dass sie durch den Luftsauerstoff geradezu getödtet würden: obligat-anaërobiotische. Noch andere Arten kennen wir, bei denen im geraden Gegensatze hierzu mit der Lebensthätigkeit eine Uebertragung von Sauerstoff auf das Substrat vor sich geht: sie erregen Oxydationsgährungen.

Unter den Saprophyten giebt es Arten, welche aus dem leblosen Substrate bei dessen Zersetzung giftige Producte Toxalbumine, Ptomaine, Toxine bilden, welche den thierischen Organismus vergiften, ohne dass diese Giftbildner als ächte Parasiten erscheinen und in den lebenden Organismus eindringen.

Unter den parasitisch lebenden Bakterien giebt es Arten, welche zur vollen Entwicklung durchaus nicht auf den thierischen Organismus angewiesen sind, sondern nur gelegentlich als Parasiten auftreten oder nur einen Theil ihrer Entwicklung im lebenden Organismus durchmachen: van Tieghem's facultative Parasiten. Andere Arten finden in der Regel nur im lebenden Organismus alle Lebensbedingungen, können aber gelegentlich oder in bestimmten Stadien der Entwicklung auch saprophytisch leben: de Bary's facultative Saprophyten. Noch andere Arten endlich scheinen nur der parasitischen Lebensweise angepasst und ganz unfähig zu sein, noch in irgend einem Stadium saprophytisch aufzutreten; diese nennt de Bary streng obligate Parasiten. Wenn es auch im einzelnen Falle oft recht schwer sein mag zu bestimmen, ob ein parasitischer Mikroorganismus dieser oder jener Gruppe angehört, wenn in solchen Fällen auch die Erkennung feiner Differenzen mehr oder weniger von dem subjectiven Urtheile des Beobachters abhängig bleibt, so gestattet diese Gruppirung doch viel zwangloser den realen Verhältnissen gerecht zu werden, als die nur die Extreme berücksichtigende Eintheilung der pathogenetischen, infectiösen Mikroorganismen in ektogene und endogene. Diese letzteren

Bezeichnungen gestatten nur ungenügend die Ermittelungen über die Hülfsursachen der Infectionskrankheiten zu verwerthen oder führen zu einer höchst einseitigen Hervorhebung des einen oder anderen Faktors, aber nicht zu einer unbefangenen Beurtheilung aller für die Aetiologie wichtigen Momente. Auch unter den parasitischen Bakterien ist das Sauerstoffbedürfniss ein höchst differentes. Die Abspaltung der giftigen Körper aus dem genuinen Eiweiss des Körpers ist das wichtigste Moment der Pathogenität, so dass auch die im Blut lebenden Bakterien nicht auf Kosten des dort locker gebundenen Sauerstoffs und durch Cyanose, sondern in erster Linie durch die anaërobe Abspaltung von Toxinen zu ihrer deläteren Wirkung kommen. Dann ist zu beachten, dass die Parasiten endophytisch im Innern der Organe oder Zellen leben können, oder vielleicht auch epiphytisch auf der Aussenfläche des Wirthes.

Diese verschiedenen Anpassungserscheinungen lassen sich theoretisch herleiten aus der einfach saprophytischen Lebensweise, wobei aber zu beachten ist, dass directe Zwischenglieder nur gelegentlich nachweisbar sind und einzelne Arten verschiedene Wirkungen ausüben können.



Die allgemeinste Aufgabe, welche der Bakterienforschung gestellt ist, lässt sich nun kurz dahin präcisiren, zu bestimmen, welcher dieser Gruppen eine Bakterienart angehört.

I. Es ist zu ermitteln ob überhaupt bei einer Zersetzung oder Krankheit Bakterien vorhanden sind oder nicht.

II. Wenn Bakterien vorhanden sind, ist zu ermitteln, welche Formen dieselben haben und ob sich die Formen im Verlaufe der Zersetzung und Krankheit ändern.

III. Jede als anwesend gefundene Form ist rein von allen chemischen und morphologischen Beimengungen für sich zu kultiviren: Reinkulturen.

Die mit Hülfe der Reinkulturen zu lösende Aufgabe ist eine zweifache, indem mit Hülfe derselben die allgemeine morphologische Orientirung ergänzt und erweitert wird und

IV. durch Uebertragung von wirklichen Reinkulturen auf zersetzungsfähige Substrate oder empfängliche Thiere nachzuweisen ist, dass die gefundenen Bakterien die Erreger einer Zersetzung oder Krankheit sind.

Ist durch diese Ermittelungen sichergestellt, welcher der geschilderten Gruppen eine Bakterienart angehört, dann sind, gleichfalls ausgehend von Reinkulturen, noch

V. eine Reihe weiterer biologischer Aufgaben zu lösen, welche in Verbindung mit den ersten Fragen die breite Basis für die theoretischen Betrachtungen und das praktische Handeln liefern.

Die zersetzungsfähigen Substrate, Lösungen von Zucker, Glycerin etc., werden nach den Anhaltspunkten hergestellt, welche das spontane Vorkommen an die Hand giebt.

Die Impfungen werden derart vorgenommen, dass man mit einer Platinnadel von einer Reinkultur in Gelatine oder Agar-Agar unter Controlle des Mikroskops eine Spur entnimmt und dieselbe unter schnellem Oeffnen in die Lösung bringt. In diesem Falle bringt man nicht nur einen Keim, sondern eine grosse Anzahl derselben Keime ein, welche dadurch sofort in die Lage versetzt werden etwaige Mitbewerber in der zusagenden Lösung leichter zu unterdrücken. War die Reinkultur durch die Verdünnungsmethode als Ein-Zell-Kultur hergestellt, so überträgt man mit sterilisirten Pipetten die Volumeneinheit (ein Tropfen, ein Cubikcentimeter) mit dem einen hypothetischen Keime in die sterilisirte Lösung.

Da eine Luftinfection in Flüssigkeiten nicht sofort erkennbar und die bei den Kulturen in Flüssigkeiten und bei den fractionirten Kulturen besprochene Möglichkeit nie ganz auszuschliessen ist, dass irgend ein derartiger zufällig hineingelangter Keim von gewöhnlichen saprophytischen Bakterien alle Anderen überwuchert, muss man bei allen Untersuchungen in Flüssigkeiten eine grössere Zahl Einzelversuche ansetzen. Es empfiehlt sich diese Uebertragungen im keimfreien Raume in einem feucht gehaltenen Glaskasten vorzunehmen.

Eine gewisse Begünstigung des Wachsthums und der Wirkung erfahren wohl alle saprophytischen Bakterien durch Steigerung der Temperatur. Aber das Temperaturoptimum der verschiedenen Arten schwankt und liegt für viele Fermentbakterien ungefähr bei der Bluttemperatur. Man muss deshalb nach der Beschickung der Lösungen einzelne bei Zimmertemperatur, andere bei Brüttemperatur halten, um die zusagende Temperatur in Kürze annähernd zu ermitteln.

Die Controlle erfolgt nach drei Richtungen, indem einmal sterilisirte, ungeimpfte Lösungen denselben Aussenbedingungen ausgesetzt werden, zweitens durch das Mikroskop und drittens durch Reinkulturen.

Wenn in den geimpften Lösungen sich für das Auge eine Aenderung bemerkbar macht, z. B. durch Trübungen, Wolken, Häutchen, Blasenbildung, so wird die Lösung mikroskopisch durch Deckglas-Trockenpräparate geprüft, indem man vorsichtig mit sterilisirten Instrumenten, Platinöse oder Pipette, Proben entnimmt. Man achtet ob nur ein und dieselbe Form vorhanden ist und ob die Formen identisch sind mit den in den Reinkulturen beobachteten. Differenzen können daher rühren, dass die Lösungen den Bakterien mehr zusagen als die festen Nährböden. Dann stellen sich auf der Höhe der Gährungen und noch mehr gegen Ende derselben bisweilen Involutionsformen ein oder es treten in mehr typischer Weise bei einzelnen Bakterien, besonders den Stäbchen, eigenthümliche Erweiterungen ein, welche den Stäbchen eine Wetzstein-, Spindel- oder Kaulquappenform verleihen. Wenn solche Erscheinungen boobachtet werden, ist zu ermitteln, ob derartige Formen mit der Gähr-

wirkung, d. h. gesteigerter Function, zusammenhängen, oder ob sie im Gegentheil das erste sichtbare Zeichen der totalen oder partiellen Erschöpfung des Nährbodens sind oder ob sie die Sporenbildung vorbereiten, durch welche bei Erschöpfung des Substrates die Erhaltung der Art gesichert wird.

Hierüber gibt das Mikroskop allein keine Auskunft. Man macht deshalb, wenn man derartige Formen sieht, Kulturen, in denen verschiedene Arten sich entwickeln, wenn neben den verimpften fremde Bakterien sich eingeschlichen haben, in denen bei wirklich reiner Uebertragung nur die verimpfte Art auftritt. Bei derartigen Controll-Kulturen, welche möglichst schnell Aufschluss geben sollen, machen sich die eigenthümlichen Vorzüge der Plattenkultur mit gelatinirenden Medien sehr eklatant bemerkbar, während die Verdünnungsmethode in Flüssigkeit hierfür meist zu zeitraubend ist.

Nachdem durch Uebertragen der Nachweis geliefert ist, dass die bei einer Zersetzung oder Krankheit beobachteten Bakterien die Erreger dieser Vorgänge sind, muss ermittelt werden, ob eine saprophytische Art nur diese eine Zersetzung oder Fermentation veranlasst oder ob sie in anderen Medien anders wirkt, so bilden z. B. die Buttersäurebakterien nach Fitz aus Saccharaten Buttersäure als Hauptproduct und Spuren von Butylalkohol als Nebenproduct, während sie aus Glycerin neben Buttersäure reichlich normalen Butylalkohol und Propylglycol und Spuren von Milchsäure als Nebenproduct bilden. Es ist ferner ermittelt, dass verschiedene Bakterienarten scheinbar dieselbe Zersetzung hervorrufen können, insofern sie dasselbe Hauptproduct bilden. So rufen mehrere Bakterienarten in Saccharaten Buttersäuregährung hervor, während wieder mehrere andere Arten Milchsäure als Hauptproduct abspalten; es giebt mehrere Arten, welche Harnstoff zu hydratisiren vermögen. In allen diesen Fällen sind aber die quantitativen Verhältnisse der Hauptproducte verschieden, es werden verschiedene Nebenproducte gebildet und die übrigen biologischen und morphologischen Eigenschaften sind different. Weiter ist zu beachten, dass Fermentbakterien auf bestimmten Substraten charakteristische Pigmente bilden, oder dass sie auf bestimmte Thiere pathogenetisch wirken können. Nach

Brieger tödten z. B. bestimmte Bacillen, welche in Saccharaten Propionsäuregährung hervorrufen sollen, Meerschweinchen. Es ist demnach durch möglichst grosse Variation der Nährsubstrate und der Nebenbedingungen und durch Uebertragungen auf verschiedene Thierspecies zu ermitteln, ob die saprophytischen Bakterien, und speciell die Ferment- und Pigmentbakterien nur eine einzige Zersetzung erregen, oder ob sie in verschiedenen Substraten verschiedene Zersetzungen erregen, ob sie Pigmente bilden, ob sie durch Toxine giftig wirken, oder ob sie auch parasitischer Lebensweise fähig sind.[1])

Auch die Reinkulturen der infectiösen Bakterien sind auf verschiedene Substrate zu übertragen, da sie möglicherweise Substrate, auf denen sie zu leben vermögen, in einer mehr typischen Weise zersetzen können. Die Bacillen des Rotz z. B. bewirken auf einzelnen Substraten die Bildung eines braunen Pigments, die Spirochäten der Cholera asiatica bilden ein bräunliches Pigment und spalten aus Saccharaten Buttersäure ab und die Kokken der Osteomyelitis bewirken Milchsäuregährung und rufen ein gelbes Pigment hervor.

Die Herstellung der Substrate und die Uebertragung auf dieselben erfolgt in der früher angegebenen Weise. Besonders ist hierbei zu achten, ob sich mit Aenderung des Substrates die Form in irgend einer Weise ändert oder neue Formen auftreten. Durch Herstellung von Reinkulturen ist jedesmal eine sorgfältige Controlle der Uebertragungen zu machen, sobald irgend welche Eigenthümlichkeiten oder Abweichungen von den schon bekannten Formen beobachtet werden.

Mit Hülfe der Reinkulturen ist zu ermitteln, ob die Bakterien ihren Stickstoffbedarf nur aus Serum-Albumin oder Pepton,

---

[1]) cfr. über diese Möglichkeiten: Fitz, Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 1882, S. 867; 1884, S. 1188; Leube und Graser, Virchow's Archiv 1885, Bd. 100, S. 540; meine Angaben in der deutschen med. Wochenschrift 1884, No. 48 bis 50, im Journal für Gasbeleuchtung und Wasserversorgung 1887, No. 11 ff., und meinen Vortrag über Beziehungen der Fäulniss zu Infectionskrankheiten 1887.

ihren Kohlenstoffbedarf nur aus Zucker zu befriedigen vermögen, oder ob sie ihn einfacheren Verbindungen entnehmen können. Die Zusammensetzung solcher Lösungen und die Variation der Mineralbestandtheile erfolgt nach Kap. 2.

Vermögen die Bakterien feste Albuminate, hartgekochtes Hühnereiweiss, Fibrin, geronnenes Caseïn zu lösen, zu peptonisiren?

Durch Säure frisch gefälltes Caseïn wird bis zur Entfernung der saueren Reaction mit destillirtem Wasser gewaschen; ebenso wird frisch gewonnenes Fibrin gründlich ausgewaschen. Am besten macht man zur Orientirung drei Parallelversuche, indem man in einige Reagirgläser nur ein Bröckchen Caseïn oder eine Fibrinflocke resp. einen Würfel Hühnereiweiss bringt; in andere Gläser kommt ein Zusatz von 0,1 % Fleischextract und in eine dritte Reihe Gläser noch ausserdem 0,5 % Traubenzucker. Die Gläser werden erst sicher sterilisirt und nach dem Abkühlen geimpft und zum Theil bei Zimmer-, zum Theil bei Brütofentemperatur gehalten; in anderen Versuchen ist auch auf Anaërobiose Rücksicht zu nehmen. Durch Impfungen sterilisirter, schwach sauerer, ampotherer und alkalischer Milch ist zu sehen, ob Bakterien das Caseïn durch Säurebildung zur Gerinnung bringen, oder ob sie das Caseïn labähnlich ausscheiden und das ausgeschiedene Caseïn lösen.

Durch Impfungen von Milchzucker- oder Rohrzuckerlösungen wird ermittelt, dass Bakterien Disaccharate verwerthen, worbei besonders darauf zu achten ist, ob dabei diese Disaccharate unter Aenderung des Drehungsvermögens des Zuckers erst in die einfachen Saccharaten gespalten, also hydratisirt werden. Durch Uebertragungen auf Stärkelösungen und Stärkekleister wird erkannt, dass die Bakterien Stärke lösen und in Zucker überführen oder nicht. Bei diesen Versuchen ist dem Zucker resp. der Stärke in einzelnen Gläsern nichts, in anderen 1 p. M. Fleischextract und in einer dritten Reihe 1 p. M. Fleischextract und 0,5 p. C. Pepton zuzusetzen.

Bei höheren Organismen sind alle derartigen hydrolytischen Spaltungen, wie sie durch Diastase, Pepsin, Lab u. s. w. ausgeübt werden, ziemlich sicher zurückzuführen auf chemische Fermente,

Enzyme,

welche zwar noch in keinem Falle als chemische Individuen nachgewiesen sind, aber doch von den dieselben producirenden Zellen getrennt werden können und dann auch ausserhalb des Organismus Hydratationen[1]) bewirken. Wenn durch Bakterien derartige Hydratationen ausgeübt werden, ist durch Versuche direct zu ermitteln, ob diese Prozesse von den Bakterien trennbare, ächte Enzymwirkungen sind, oder ob dieselben von der lebenden Zelle nicht isolirt werden können. Von Krukenberg wurden Hydratationen ohne trennbare Enzyme bei niederen Thieren sichergestellt; ich vermochte die Hydratation des Milchzuckers durch die Milchsäurebacillen nicht von diesen Bakterien zu trennen und Leube gelang es nicht, ein Enzym von den Bakterien der Harnstoffgährung zu trennen.

Es liegt nicht der geringste Grund vor, jede durch Bakterien ausgeübte Hydratation ohne weiteres als Wirkung eines trennbaren, isolirbaren, ächten Enzyms aufzufassen, sondern es sind hierüber nur directe Versuche entscheidend. Die Einzelheiten dieses Nachweises gehören wesentlich in das Gebiet der Chemie[2]). Der allgemeine Gang beruht darauf, dass durch Alkohol die Enzyme mit den Albuminaten niedergerissen werden; dann werden dieselben mit Glycerin oder Wasser aufgenommen und dadurch von den Albuminaten getrennt, und dies wird event. wiederholt. Diese Prozeduren müssen in sterilisirten Lösungen gemacht werden, welche mit Reinkulturen geimpft waren, wobei besonders auf etwaige Anwesenheit von Sporen zu achten ist. Weigert[3]) hatte schon früher gefunden, dass Glycerin für diese Zwecke bisweilen im Stiche lässt, und ich[4]) fand, dass Alkohol und Glycerin zur sicheren Trennung der Enzyme nicht immer ausreichen, besonders wenn Sporen vorhanden sind.

---

1) Kühne: Erfahrungen und Bemerkungen über Enzyme und Fermente. Untersuch. des physiologischen Instituts der Universität Heidelberg, Bd. I, Heft 3, 1877.

2) cfr. A. Mayer: Die Lehre von den chemischen Fermenten 1882.

3) Ueber Glycerin als Unterscheidungsmittel geformter und ungeformter Fermente. Deutsche med. Wochenschrift 1877, No. 40/41.

4) Mittheilungen aus dem K. Gesundheitsamte, Bd. II. 1884, S. 343.

Auch durch Filtration kann man versuchen Enzyme von der bakterienhaltigen Flüssigkeit zu trennen. Die Filtration kann man sowohl direct als in Verbindung mit den vorher angegebenen Fällungsmethoden vornehmen. Bei den Experimenten über Enzyme ist es unbedingt nöthig, durch controllirende Reinkulturen, besonders Plattenkulturen, zu ermitteln, ob nicht trotz aller Vorsicht Bakterien mit übertragen wurden. Vergl. hierzu S. 220 und 225.

Bei solchen Bakterien, welche keine widerstandsfähigen Dauersporen bilden, kann man die enzymhaltigen Kulturen auf etwa 50 bis 60° kürzere Zeit erwärmen. In manchen Fällen, z. B. bei den Spirochaeten der Cholera asiatica, reicht dies aus um die Bakterien zu tödten ohne die Enzyme wesentlich zu schädigen. Sowohl für die Bildung der Enzyme als für die Prüfung derselben muss die Reaction des Mediums sehr genau festgestellt und innegehalten werden.

Während bei den parasitischen Bakterien im engeren Sinne die Uebertragung selbst, die Infection, geknüpft ist an die Uebertragung der Bakterien, kann die Wirkung als solche vielleicht trennbar sein dadurch, dass diese Bakterien isolirbare Albuminate, Enzyme oder basische, alkaloïdähnliche Körper,

Ptomaine, Toxine, Toxalbumosen

bilden, welche die eigentliche Giftwirkung ausüben. Durch Bildung solcher giftiger Produkte aus den Albuminaten können selbst Fäulnissbakterien Intoxicationen ausüben, ohne dass sie wirkliche, durch die Bakterien selbst übertragbare Infectionskrankheiten bewirken. Der Nachweis derartiger Gifte erfolgt zum Theil wie bei anderen Eiweisskörpern und Enzymen, zum Theil deckt er sich mit dem Nachweis der Alkaloïde nach dem Verfahren von Dragendorff oder Stas-Otto[1]), zum Theil sind die Methoden noch auszuarbeiten, wie dies besonders von Brieger[2]) in der letzten Zeit geschehen ist.

---

[1]) Otto: Anleitung zur Ausmittlung der Gifte, 4. Aufl., 1884. — Ludwig: Medicinische Chemie 1885.

[2]) Ueber Ptomaine Heft 1 bis 3, 1885—87.

Die für die Pathogenität der Infectionserreger wichtigsten giftigen Eiweisskörper und Enzyme sind unter den Albumosen und den an sich schon giftigen Peptonen gefunden worden. Bei den genauer geprüften hierher gehörigen Körpern war die Wirkung annähernd innerhalb derselben Temperaturgrenzen und vertrugen dieselben das Kochen nicht ohne Einbusse oder Verlust ihrer giftigen Eigenschaften. Auch unter den Globulinen scheinen sich solche Giftkörper zu finden. Zur Gewinnung solcher Gifte ist oft die Wahl genuiner Eiweisskörper unerlässlich und ebenso muss meist beobachtet werden, dass diese Spaltungsproducte sich oft nur bei Luftabschluss bilden oder anhäufen können, während sie bei Luftzutritt weiter zerlegt, oxydirt und so wieder vernichtet werden.

Neben diesen Toxalbumosen im engeren Sinne, welche für die typische Giftwirkung der einzelnen Infectionserreger charakteristisch sind, finden sich bisweilen unter den Stoffwechselproducten bei Kultur in Flüssigkeiten Eiweisskörper, welche gleichfalls giftig sind, aber höhere Temperaturen, bisweilen selbst wiederholtes Kochen und Temperaturen über 100° vertragen. Diese Stoffe scheinen sich wesentlich als die Schutzstoffe bei den Impfungen herauszustellen und unter ihnen finden sich auch die Körper, welche man zu Heilimpfungen, also als specifische Heilmittel verwerthen kann.

Ausserdem kann man den Bakterien, welche auf festem Nährboden gewachsen sind, nachdem sie getödtet wurden, nach H. Buchner[1]) durch Extraction mit verdünnter Kalilauge Proteïne entziehen, welche reactive Entzündung und selbst ausgesprochene Eiterung erregen. Eine von Koch[2]) angedeutete directe Extraction solcher Kulturen mit 40=50%igem Glycerin gelingt dagegen nicht immer, wohl aber nach Scholl und mir[3]) bei Kulturen in Flüssigkeiten.

Für den Nachweis von Toxinen post mortem z. B. in der gerichtsärztlichen Praxis war es bisher ein schwerwiegender Uebelstand, dass die Toxine spontan durch Spaltung oder Oxydation während

---

[1]) Berliner klin. Wochenschrift 1890, No. 30.
[2]) Deutsche med. Wochenschrift 1891, No. 3.
[3]) Berliner klin. Wochenschrift 1891, No. 4 und 8.

der Fäulniss oder auch durch die zum Nachweise verwendeten Methoden verändert und so dem Nachweise entzogen werden können. Jetzt ist man im Stande, sehr oft die Toxine bildenden Organismen zu isoliren und man kann dann in aller Ruhe deren Eigenschaften studiren und dieselben mit den intra vitam beobachteten Symptomen vergleichen.

Während ein grosser Theil der bis jetzt betrachteten biologischen Aufgaben nur von dem chemisch geschulten Forscher gelöst werden kann, restiren noch einige fundamentale Aufgaben wesentlich experimenteller Art.

Die wichtigsten dieser Aufgaben bestehen darin, die Beziehungen rein kultivirter Mikroorganismen zu physikalischen und chemischen Agentien, wie Temperatur, Druck, Licht, Electricität und zu Chemikalien zu ermitteln. Soweit man Einwirkungen wahrnahm, bestanden dieselben nach den ersten Versuchen darin, dass die Eingriffe das Wachsthum unmöglich machten oder dass sie nach eingetretenem Wachsthum das Leben vernichteten. Die Untersuchungen über Anaërobiose, die Frage der Schutzimpfungen haben aber bereits gezeigt, dass wir mit viel feineren Abstufungen zu rechnen haben. Dasselbe Mittel kann je nach der Intensität seiner Wirkung ganz verschieden wirken und bald die Zellen reizen und begünstigen, bald in ihrer Entwicklung hemmen, bald vernichten.

Unter den Chemikalien glaubte man vielfach Unterschiede derart machen zu können, dass einzelne Mittel, wie Phenol, Salicylsäure, als gelegentliche Stoffwechselproducte gleichsam physiologische Desinfectionsmittel sind, während andere, wie Sublimat, Arsen immer als Protoplasmagifte auftreten. Untersuchungen von H. Schulz[1]) haben aber speciell für Hefe gezeigt, dass sowohl die in stärkeren Gaben giftigen Stoffwechselproducte, die homologen, als auch die heterologen Protoplasmagifte in gewissen Verdünnungsgraden „die Thätigkeit der Hefe auf kürzere oder längere Zeit bedeutend über die Norm steigern.“ Hieraus leitet Schulz das Gesetz her, „dass jeder Reiz auf jegliche lebende Zelle eine Wirkung ausübt, deren

---

[1]) Virchow's Archiv 1887, Bd. 108, S. 427; Archiv für die gesammte Physiologie 1888, Bd. 42, S. 517.

Effect hinsichtlich der Zellenthätigkeit umgekehrt proportional ist der Intensität des Reizes."

Jeder physikalische, chemische und physiologische Eingriff wirkt innerhalb einer gewissen Breite auf Auskeimen und Wachsthum von Mikroorganismen:

I. Begünstigend, als Reiz, und in dieser Breite besteht für jedes Agens ein Optimum seiner Wirkung.

II. Bei Steigerung des Reizes wirkt er abschwächend, die vitale Energie herabsetzend, oder entwicklungshemmend, aber noch nicht das Leben verhindernd oder tödtend.

III. Bei anderen Graden der Intensität verhindert er das Auskeimen. Mit spezieller Beziehung zu den Fäulnissvorgängen und der Wundbehandlung bezeichnet man dies auch als Asepsis oder Kolysepsis (G. Samter).

IV. Er tödtet Bakterien im vegetativen Zustande und verhindert deren weiteres Wachsthum = Antisepsis.

V. Er vernichtet die Keime ohne Rücksicht darauf, ob sie sich im vegetativen oder Dauerzustande befinden = Sterilisation und Desinfection.

Zwischen diesen Gruppen giebt es keine scharfe Trennung und für jede Art müssen die Beziehungen des Eingriffes gesondert ermittelt werden und derselbe Eingriff kann nach den verschiedenen Bedingungen und den chemischen oder physikalischen Veränderungen des Mediums verschieden einwirken. Diese Ermittelungen sind deshalb wichtig, weil man seit Pasteur's Vorgang bemüht ist durch verschiedenartige Eingriffe die infectiösen und toxischen Wirkungen der Bakterien so herabzusetzen, dass die resultirenden Kulturen bestimmte vitale Eigenthümlichkeiten bekommen und weiter vererben. Wenn Flügge Werth darauf gelegt hat, dass viele dieser Eingriffe die Arten degeneriren machen, so muss dem gegenüber auch hervorgehoben werden, dass dieselben Eingriffe bei anderer Intensität oder dass andere Eingriffe die abgeänderten Abkömmlinge auch für die neuen Bedingungen besser geeignet machen, so dass keine degenerirte Art, sondern eine kräftige Modification oder Varietät der Art sich bildet. Jeder Versuch die Infectionskrankheiten etwa in Gruppen zu theilen, deren eine auf Eingriffe lebenskräftige Modifi-

cationen oder Varietäten bildet (wozu Flügge z. B. Rotz, Lepra rechnet), deren andere aber degenerirte Arten bildet (wozu Flügge z. B. Milzbrand, Schweinerothlauf, Hühnercholera. Tuberkulose zählt), scheitert an den angegebenen Uebergangsformen. So hat z. B. Prazmowski eine ächte nicht virulente Modification des Milzbrandes hervorgerufen; von der Gruppe der Septikaemia haemorrhagica (Wildseuche, Schweineseuche, Hühnercholera) habe ich dasselbe angegeben; Tuberkelbacillen wachsen auf Glycerinagar, bisweilen unter Verminderung oder Verlust der Virulenz, viel üppiger, als die virulent bleibenden auf Blutserum und bilden demnach eine ächte Modification.

Mittel, welche in Kulturen die Entwicklung und das Wachsthum verhindern, hemmen oder die Bakterien tödten, können im Körper ganz unwirksam sein. Umgekehrt können Mittel, welche ausserhalb auf Bakterienkulturen unwirksam sind, vielleicht im Körper sich anders verhalten. Dieselben können z. B. nach H. Buchner indirect antiseptisch wirken, indem sie die Widerstandsfähigkeit der Gewebe erhöhen. Nach meinen Beobachtungen wirken unsere bisherigen specifischen Mittel im Körper nicht antiparasitisch, sondern in Folge der geringen zur Wirkung gelangenden Mengen specifisch reizend. Andere Körper werden erst im Körper in wirksame Componenten gespalten oder sie sind nur in alkalischen Medien wirksam. So passiren z. B. Tribromphenol und Salol den saueren Magensaft unzersetzt und das erstere kann als solches erst im alkalischen Darmsafte wirken, während die Salole im alkalischen Darmsafte in die wirksamen Bestandtheile zerfallen. Bei einigen auf Bakterien-Kulturen unwirksamen Mitteln, z. B. Jod-, Brom- oder Chlorverbindungen, besteht die Möglichkeit, dass sie entweder indirect antiseptisch wirken oder dass durch das lebende Gewebe freies Jod, Chlor oder Brom abgespalten wird, welches in statu nascendi zur Wirkung kommt, wie es z. B. für das Jodoform wahrscheinlich ist.

Verhalten zur Temperatur.

Es ist zu ermitteln, bei welcher niedersten Temperatur eine rein kultivirte Bakterienart anfängt sich zu vermehren, zu Kolonien

auszuwachsen. Man impft zu diesem Zwecke sowohl feste Gelatine in Reagirgläsern stichförmig, als sterilisirte Lösungen mit Reinkulturen und setzt die Gläser in Eis- oder Schneewasser, um die Temperatur von 0° längere Zeit zu halten, oder wochenlang in den Eisschrank, dessen Temperatur im Allgemeinen nicht unter 5° sinkt und 8° nicht übersteigt. Temperaturen über 8° bis zur Zimmertemperatur erreicht man am besten in kühlen Zimmern, in Gefässen mit doppelten Wandungen, durch welche fortwährend kaltes Leitungswasser circulirt, unter Controlle eines Soxhlet-Rohrbeck'schen Thermoregulators. Für Temperaturen über 15° bis zur Bluttemperatur dienen die früher angegebenen Thermostate, S. 233.

Mit Hülfe eines Thermostaten ist das Temperatur-Optimum zu ermitteln, d. h. diejenige Temperatur, bei welcher die Bakterien sich am intensivsten vermehren und wirken. Man impft zu diesem Zwecke Nährgelatine resp. Agar-Agar, festes Blutserum, Kartoffelscheiben mit den Reinkulturen und ermittelt die Zeit, innerhalb welcher deutliche, charakteristische Kolonien sich bilden. Dann impft man sterilisirte Nährlösungen in Reagirgläsern und Erlenmeyer'schen Kölbchen mit den Reinkulturen und ermittelt durch von Zeit zu Zeit vorgenommene Prüfungen, bei welcher Temperatur das Maximum der Wirkung, z. B. ein bestimmter Säuregrad, in kürzester Zeit erreicht wird. Das Optimum der Temperatur für Vermehrung und Wirkung schwankt bisweilen nur innerhalb weniger Grade, zeigt aber oft auch eine grosse Breite. Jenseits des Optimums folgt wieder eine Abnahme der Wachsthums- und der Wirkungsintensität. Zur Ermittlung dieser Grenze impft man die Reinkulturen sowohl auf feste Medien, als in zusagende Flüssigkeiten. So ermittelte ich z. B., dass die Vermehrung und Wirkung der Milchsäurebakterien zwischen 45,3 und 45,5° C. in Milch und 3 bis 4 %igen Zuckerlösungen aufhört, ohne dass aber eine Tödtung der Bakterien erfolgte. Diese Grenze bezeichnet zunächst nur eine Entwicklungshemmung, eine Art Wärmestarre, oberhalb der erst die eigentliche Vernichtung der Bakterien erfolgt.

Nachdem im Februar 1880 Pasteur die Entdeckung mitgetheilt hatte, dass durch biologische Eingriffe die Bakterien der Hühnercholera in ihrer Virulenz abgeschwächt werden, und dass

Impfungen mit diesen abgeschwächten Bakterien die Thiere gegen Impfungen mit virulentem Material schützen, ermittelte Toussaint dass man virulentes Milzbrandblut durch 10 Minuten langes Erwärmen auf 55° oder durch Zusatz von Karbolsäure in seiner Virulenz hesabsetzen kann, und Pasteur fand bald darauf, dass man durch Kultiviren der reinen Milzbrandbacillen in Bouillon bei 42 bis 43° die Virulenz dieser Bakterien systematisch herabzusetzen vermag. A. Chauveau[1]) ermittelte dann, dass bei 52° 15 Minuten, bei 50° 20 Minuten, bei 47° 3 bis 4 Stunden, bei 43° etwa 6 und bei 42° fast 20 Tage zum selben Grade der Abschwächung erforderlich sind, dass aber die Sicherheit und die Constanz der Abschwächung um so grösser ist, je niedriger die Temperatur ist. Koch, Gaffky und Löffler[2]) präcisirten diese Ermittelungen noch genauer für die Temperaturen zwischen 42 und 43°.

In ähnlicher Weise ist zu ermitteln, bei welchen unteren und oberen Temperaturen sich Sporen bilden und unter- und oberhalb welcher Temperaturen keine Sporen gebildet werden. Innerhalb dieser Grenzen ist das Optimum der Temperatur für die Sporenbildung dadurch zu ermitteln, dass man die Menge der Sporen, die Regelmässigkeit ihrer Bildung in den Kulturen beobachtet und die Zeit feststellt, zu der sich die ersten Sporen finden. Auch die zum Auskeimen erforderliche Zeit ist unter verschiedenen Temperaturverhältnissen zu ermitteln.

Diese Ermittelungen über die niedrigste Temperatur, bei welcher eine Bakterienart eben noch sich vermehren kann; über die Höhe und Breite des Temperatur-Optimums und über die obere Temperatur, bei welcher eine Art nicht mehr wirkt; ferner die Beobachtungen über die unteren und oberen Temperaturen, bei denen keine Sporenbildung mehr eintritt, und die Ermittelungen über das Optimum zur Sporenbildung und die zur Sporenauskeimung erforderliche Temperatur gestatten fast allein schon den Grad der Anpassung an die parasitische Lebensweise richtig zu beurtheilen.

---

[1]) Comptes rendus. T. 96, 1883, No. 9, 10 und 11.

[2]) Mittheilungen aus dem K. Gesundheitsamte, Bd. II, 1884, S. 147.

Um die Temperatur genauer festzustellen, bei welcher Sporen getödtet werden, wendet man am bequemsten ein recht tiefes Wasserbad mit constantem Niveau an. Das Wasser des Bades muss höher stehen als das Niveau der Flüssigkeit in den Gläsern, in denen die Temperatur etwas niedriger bleibt wie im Wasserbade, so dass die ermittelten Zahlen nicht genau den wirklich in den Gläsern erreichten Temperaturen entsprechen. Wenn der Temperaturausgleich angenommen werden kann, nach ca. $^1/_2$ Stunde, werden die Gläser unter schnellem Oeffnen mit den Sporen geimpft und wiederholt hin und her bewegt. Man lässt die Gläser bei verschiedenen Temperaturen, z. B. Siedetemperatur, 95°, 90° bis 70° verschieden lange Zeit, bringt dann einige Gläser in das Temperaturoptimum der betreffenden Art, um durch Auftreten oder Ausbleiben von Trübungen auf die Tödtung zu schliessen. Den Inhalt anderer Gläser kann man mit Gelatine mischen und zu Plattenkulturen verwenden. Zum Studium der Temperatur über 100° bedient man sich für diese Ermittelungen der Salz- oder Oelbäder oder des gespannten Dampfes.

Auch die Sporen können vor der Tödtung eine Abschwächung erfahren, was durch Uebertragungen auf zusagende Lösungen oder Thiere festzustellen ist. Als Anhalt über die grossen Temperaturdifferenzen, welche bei Bakterien zu beachten sind, kann dienen, dass nach Forster[1]) und Fischer[2]) der M. phosphorescens bei 0° in 6 bis 8 Tagen deutliches Leuchten auf Fischen bewirkt, und dass es Fischer und Jahn gelang, aus Seewasser und Erde 14 Arten zu kultiviren, welche bei 0° wachsen. Zopf[3]) fand eine Clostridiumart, welche im Wasser Sporen bildete, als sich dasselbe bereits mit Eis bedeckte. Die meisten Saprophyten verfallen schon bei ca. 5° einer Art Kältestarre und vermehren sich erst oberhalb dieser Temperatur; die meisten Wasser- und Erdbakterien haben ihr Temperaturoptimum bei ca. 20 bis 25°; für die pathogenen Bakterien liegt die Kältestarre höher und ihr Optimum ist bei Blut-

---

[1]) Centralbl. f. Bakteriologie 1887, Bd. II, No, 12.
[2]) ibid. 1888, Bd. IV, No. 3.
[3]) Die Spaltpilze, 3. Aufl. 1885, S. 36.

temperatur. Globig[1]) kultivirte aus Erde Bakterien, welche auf Kartoffeln nicht unter 50° wuchsen, bei ca. 56 bis 58° ihr Optimum hatten und bis zu 70° vertrugen. Die Wachsthumsgrenzen sind manchmal sehr enge. Die frisch auf Blutserum kultivirten Tuberkelbacillen haben nach Koch ihre untere Grenze bei 28 bis 29°, ihre obere bei 40°, Globig kultivirte aus Erde einen Bacillus, welcher auf Kartoffeln nur zwischen 54 bis etwa 64° wuchs, während eine andere Art zwischen 15 und 68° sich vermehrte; vergl. auch S. 293.

Das einfache Frieren tödtet je nach den Arten und Dauerformen viele Einzelkeime, vernichtet aber immer nur einen Theil derselben, und auch noch niedrigeren Kältegraden widerstehen immer einzelne Keime und Pictet und Young[2]) geben für Bakteriengemische als Untergrenze 108 Stunden bei —70° und 20 Stunden bei —130° an. Versuche der letzteren Art sind nur gelegentlich bei physikalischen Versuchen, wie sie Pictet z. B. zum Flüssigmachen der sogenannten permanenten Gase anstellte, zu machen, während man das Frieren und die geringeren Grade mit Eis oder Kältemischungen bewirkt, in denen die Kulturen stehen blieben.

Um den Einfluss trockener Hitze zu ermitteln, tränkt man ca. 3 cm lange Stückchen Seidenfäden mit einer sporenfreien und andere mit sporenhaltiger Bakterienflüssigkeit, indem man die sterilisirten Fäden in eine Aufschwemmung der entsprechenden Reinkulturen in destillirtem Wasser einlegt, oder in das frische bakterienhaltige Blut oder den Gewebsaft einbringt. Da Seide und Catgut nach Schäfer[3]) und Braatz[4]) einige Mittel z. B. Sublimat, wie eine Beize festhalten, empfiehlt Braatz Fäden aus Baumwolle, bei welchen dies viel weniger der Fall ist. Für das wichtigste Testobject, die Milzbrandsporen, hat v. Esmarch[5]) festgestellt, dass die Widerstandsfähigkeit derselben nach der Herkunft, Alter der Kultur schwankt, so dass man die Ergebnisse verschiedener Ver-

[1]) Zeitschrift f. Hygiene 1887. Bd. III, S. 295.

[2]) Comptes rendus, Bd. 98, S. 747.

[3]) Berliner klin. Wochenschrift 1890, No. 3.

[4]) Centralblatt für Bakteriologie 1890, VIII, No. 1.

[5]) Zeitschrift für Hygiene 1889, V, S. 67.

suchsreihen nicht immer unmittelbar mit einander vergleichen, sondern stets direkte Controllversuche mit demselben Material machen muss. Dann trocknet man die Fäden im Exsiccator, legt sie in Uhrgläser und setzt sie im Trockenschranke verschieden hohen Temperaturen direct aus und bringt dann die Fäden mit einer sterilisirten Pinzette in Bouillon und auf schief erstarrtes Agar oder auf Kartoffelscheiben und drückt sie etwas in den Nährboden ein, um sie besser haften zu machen. Die Gläser kommen dann in den Brütofen.

Desinfectionsversuche mit Flüssigkeiten

stellt man derart an, dass man Uhrgläser, Krystallisationsschalen oder Reagirgläser mit einer Lösung des zu prüfenden Mittels in verschiedenen Concentrationsgraden füllt und in einzelne, nach der obigen Angabe, imprägnirte Fäden mit, in andere Fäden ohne Sporen einbringt.

Nach verschieden langer Einwirkung nimmt man die Fäden mit sterilisirter Pinzette aus den Lösungen, spült sie mit sterilisirtem Wasser ab und bringt dieselbe in Bouillon und in erstarrte Nährgelatine oder Agar-Agar, welche vorher auf Platten ausgegossen waren; man muss die Fäden etwas in das feste Substrat eindrücken. Man kann sie ebenso auf Kartoffeln übertragen. Zur Controlle nimmt man inficirte Fäden, welche gar nicht weiter behandelt wurden, und andere, welche nur mit sterilisirtem Wasser abgespült waren. Die Differenzen in der Zeit der Entwickelung oder das gänzliche Ausbleiben kann man dann direct beobachten. Eine weitere Controlle ist erforderlich dadurch, dass man Thieren solche Fäden unter die Haut bringt.

Geppert[1]) hat ermittelt, dass bei dem Auswaschen der inficirten und mit einem Desinfectionsmittel imprägnirten Fäden oft soviel dieser Flüssigkeiten in den Fäden zurückbleibt, dass ein Auswachsen der Keime nicht stattfindet, selbst wenn sie noch nicht getödtet waren und noch lebensfähig sind. Er bewies dies, indem er das (als Beize, cfr. oben) fest an die Fäden gebundene Desinfec-

---

[1]) Berliner klin. Wochenschrift 1889, No. 36; 1890, No. 11.

tionsmittel chemisch ausfällte, z. B. Sublimat durch Schwefelammon, worauf die Keime zur Entwicklung kamen.

Sehr zu beachten ist ferner von Anfang an die Reaction, da die antiseptische Leistungsfähigkeit eines Körpers oft nur von seinen saueren oder alkalischen Eigenschaften abhängt, worauf besonders Behring[1]) Werth gelegt hat. Die Desinfectionswirkung bei Sublimat, Karbolsäure kann durch Säuren verstärkt werden, während die des Aetzkalk dadurch herabgesetzt wird. Durch kohlensauren Kalk werden Säuren gebunden, so dass säurebildende Bakterien durch denselben begünstigt werden. Sublimat wird in alkalischen Medien in Quecksilberoxyd verwandelt, welches weniger wirksam ist. Kochsalz verbindet sich mit Sublimat zu einem wirksamen Doppelsalz, während Kochsalz aus Lösungen von Silbernitrat Silberchlorid ausfällt, welches in basischen Lösungen sich zu dem 3 mal weniger als Silbernitrat wirkenden Silberoxyd löst. Analog wirkt Kochsalz (im Gegensatze zu Mercurisalzen) auf Mercuroverbindungen wie Quecksilberoxydulnitrat. Praktisch ist noch besonders zu bemerken, dass bei Desinfectionsseifen der Alkaligehalt über den Desinfectionswerth entscheidet.

Besonders zu beachten ist, dass der Desinfectionswerth derselben Mittel in Bouillon und eiweisshaltigen Mitteln, wie Blutserum, beträchtlich schwankt und dass sich steriles Blut und Blutserum durchaus nicht dem sterilisirten Blute gleich verhalten.

Chamberland und Roux[2]) ermittelten den abschwächenden Einfluss der Karbolsäure, indem sie zu neutralisirter Kalbsbouillon, welche mit Milzbrandbacillen versetzt war, bestimmte Mengen des Mittels hinzufügten; $^1/_{400}$ Karbolsäure hielt die Entwicklung auf und tödtete die Bacillen in 48 Stunden, $^1/_{500}$ tödtete erst nach 5 Monaten, $^1/_{600}$ tödtete erst nach 6 Monaten. Bei $^1/_{600}$ tödteten die Bacillen nach 12 Tagen nur noch Meerschweinchen und Kaninchen (u. Mäuse) und waren nach 29 Tagen unwirksam, Zusätze bis zu $^1/_{800}$ hoben die Sporenbildung auf, welche erst bei $^1/_{1200}$ wieder

---

1) Zeitschrift für Hygiene 1889, VII, S. 467; 1890, IX, S. 395.

2) Comptes rendus. Bd. 96, 1883, No. 15.

eintrat. Auch mit Kaliumbichromat in der Stärke von 0,05% gelang ihnen die Abschwächung der Milzbrandbacillen.

Chamberland und Roux[1]) gelang es, nachdem zuerst Pasteur durch Kultur bei 42 bis 43° die Sporenbildung der Milzbrandbacillen systematisch verhindert hatte, durch Zusatz von 1:2000 Kaliumbichromat und von 8—20:1000 Phenol zur Bouillon und achtägiger Kultur bei 30 bis 33° Generationen von asporogenem Milzbrand zu züchten.

Derartige Versuche lassen sich auch in Nährgelatine machen; man fügt zu der verflüssigten Nährgelatine oder dem Agar die gewünschte Menge des zu prüfenden Mittels, impft diese Gläser nach dem Erstarren der Gelatine stichförmig und kann dann direct den Erfolg sehen. Zur Controlle impft man andere Gläser mit Nährgelatine ohne jeden weiteren Zusatz, welche dann einen schnellen Vergleich gestatten. Dies Verfahren empfiehlt sich besonders zur Orientirung und zu Demonstrationszwecken.

Den Einfluss von gelösten Mitteln auf solche Bakterien, welche nicht an Fäden angetrocknet werden können, studirt man noch bequemer derart, dass man erst frische Bouillonkulturen mit der Bakterienart anlegt, so dass man die Bakterien im kräftigsten Zustande in einem zusagenden Medium hat. Dann bereitet man sich eine Lösung der zu prüfenden Substanz von der doppelten Stärke, welche man prüfen will. Darauf fügt man von dieser Lösung eine bestimmte Menge zu der gleichen Menge der Bakterienbouillonkultur und schüttelt gut durch, um beide Lösungen zu mischen und die Bakterien gleichmässig mit dem gelösten Mittel in Berührung zu bringen. Dann entnimmt man nach bestimmter Zeit, z. B. nach 30, 45, 60 Sekunden, nach 2, 5, 10 Minuten, eine Platinöse und überträgt diese in Bouillon, welche bei Bruttemperatur gehalten wird, die etwaige schwächende Einflüsse am schnellsten ausgleicht, oder in ein Reagirglas mit verflüssigter Gelatine, mischt und legt damit eine Rollkultur an. Es giebt wohl kaum eine Aufgabe, bei der sich die Esmarch'schen Rollröhrchen so glänzend bewähren, wie derartige Desinfectionsversuche, weil man in kürzester Zeit eine

---

[1]) ibid. S. 1090 und Annales de l'Institut Pasteur, 1890, S. 25.

grosse Menge Einzelversuche fertig stellen kann. Die mitübertragene Spur des zu prüfenden Mittels schadet in der Bouillon oder dem Rollröhrchen nichts, wie man sich durch Vergleiche leicht überzeugen kann.

Henle[1]) wies darauf hin, dass die Temperatur, bei welcher die Desinfectionsversuche angestellt werden, von Einfluss auf den Erfolg ist, und dass bei höherer Temperatur grössere Wirkungen zu bemerken waren, als bei niedriger.

An sich wenig wirksame Mittel oder stark wirkende, aber wegen ihrer Nebenwirkungen nur sehr vorsichtig anzuwendende Mittel können nach Rotter[2]) durch Mischen verschiedener Mittel oft recht geeignet werden, oder dadurch dass man sie mit Säuren oder Alkalien verbindet. Statt der Mischungen, welche man z. B. durch Zusammenbringen von Schwefelsäure und Kreosol nach C. Fränkel[3]) erhält, entstehen meist jedoch neue Verbindungen, von denen ich[4]) zuerst bei Orthophenolsulfosäure exact nachwies, dass in solchen Fällen die Desinfectionskraft zunehmen kann, während gleichzeitig die Gift- und Aetzwirkung für den Menschen abnimmt.

Nach Koch[5]) sind Mittel, welche in wässeriger Lösung energisch wirken, in Oel oder Glycerin gelöst ganz unwirksam. Nach Riedlin[6]) kann man die desinficirende Kraft aetherischer Oele dadurch brauchbar machen, dass man dieselben bis zu 1 % in Emulsionen mit Seifenspiritus verwendet. Diese Emulsionen können mit Wasser verdünnt werden, so wurde z. B. 1 gr Terpentinöl in 10 gr Spirit. saponatus gelöst und dann mit 90 gr Wasser versetzt. Von dieser Lösung werden bestimmte Mengen mit Bouillon oder verflüssigter Gelatine gemischt und dann diese schief zum Erstarren gebracht. Diese Gelatine mit der Oelimmulsion wird dann strichförmig geimpft.

In Wasser unlösliche Körper wie Kresole kann man auch mit Harzseifen oder Gummi arabicum emulgieren und so wasserlöslich

---

1) Archiv für Hygiene 1889, IX, S. 197.
2) Centralblatt für Chirurgie 1888, No. 40.
3) Zeitschrift für Hygiene 1889, VI, S. 521.
4) Berliner klin. Wochenschrift 1886, No. 37.
5) Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte 1881, Bd. I, S. 234.
6) Archiv für Hygiene 1887, Bd. VII, S. 317.

machen, wie es z. B. bei Creolin und Kresolin geschehen ist. Da diese Seifen aber für die Hände und Instrumente nicht angenehm sind, ist es besser sie in anderen Salzen zu lösen.

Auf entwicklungshemmende Eigenschaften in sterilisirtem oder sterilem Blutserum prüft man nach Behring[1]) in der Art, dass man zu 10 ccm Blutserum in einem Reagirglase von der zu entnehmenden Lösung Tropfen bestimmter Grösse mit einer Bürette oder Pipette zufügt. Fasst z. B. der Tropfen 0,02 cm und ist die Lösung 5 %ig, so enthält jeder Tropfen 0,001 Substanz, auf 10 cm Blutserum also 0,0001, d. h. also dass ein Tropfen der 5 %igen Lösung aus dem Blutserum eine 0,0001 %ige Lösung darstellt. Hiervon entnimmt man einen Tropfen auf ein sterilisirtes Deckglas und impft diesen Tropfen mit frischem Milzbrand aus Blut oder Kultur und giebt das so geimpfte Deckglas auf einen hohlen Objectträger, welchen man in den Brutschrank stellt. Nach 24 Stunden sieht man unter dem Mikroskop, ob Wachsthum eingetreten ist oder nicht. Trotzdem man von sterilisirtem Blutserum nicht einmal einen fehlerlosen Schluss auf das Verhalten des sterilen Blutserums und des Blutes machen und von Milzbrand nicht gut auf andere Bakterien schliessen kann, glaubt Behring, dass nach seinen Versuchen die Antiseptica 5—7 mal giftiger für den thierischen Organismus sind als für Milzbrandbacillen und dass man aus diesem Verhalten a priori die Giftigkeit vorher berechnen kann. Nach dem in der Orthophenolsulfosäure von mir gefundenen Prinzip und der Wirkung specifischer Mittel wird man wohl auf starke Einschränkungen dieser angeblichen Gesetzmässigkeiten gefasst sein müssen.

Auch das sterile Blutserum übt bakterienfeindliche, nach Buchner[2]) besonders an die Eiweisskörper geknüpfte, und nach Behring und Kitasato[3]) ausserdem bakteriengiftvernichtende „antitoxische“ und „antifermentative“ Wirkungen aus.

---

[1]) Deutsche med. Wochenschrift 1887, No. 37; deutsche militärärztliche Zeitschrift 1888.

[2]) Centralblatt für Bakteriologie 1889, V, No. 25; VI, No. 1.

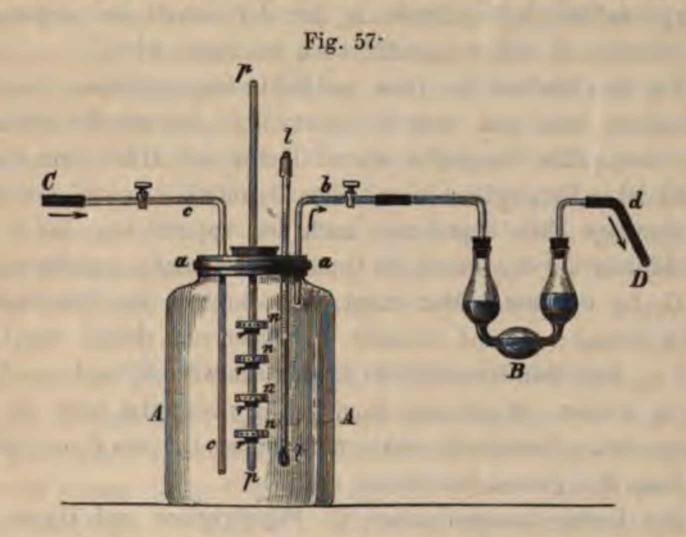
[3]) Deutsche med. Wochenschrift 1890, No. 49.

Zu Laboratoriums-Versuchen über

die Desinfection mit Gasen

empfiehlt sich folgende Versuchsanordnung nach Fischer und Proskauer[1]). Ein dickwandiger Glasballon, AA, von ca. 20 l Rauminhalt, Fig. 57, wird mit einer starken Kappe, aa, von vulkanisirtem Kautschuk verschlossen, deren Rand durch eine Schnur straff an den Flaschenhals angedrückt wird. In der Kappe findet sich central eine grössere und rings um diese noch einige kleinere Durchbohrungen, welche sämmtlich mit Kautschukpfropfen ver-

Fig. 57.



schlossen werden können. Die mittlere (5 bis 6 cm breite) Durchbohrung dient zum Einführen der Objecte. Die Versuchsobjecte werden, um den Gasen von allen Seiten den Zutritt zu gewähren, in siebartig durchlöcherte Paraffinnäpfchen n gelegt. Diese Näpfchen, deren Durchmesser zur bequemen Einführung etwas geringer ist, als der der Durchbohrung, werden an einem Glasstabe, pp, befestigt, welcher durch die Mitte ihres Bodens hindurchgeht, so dass mehrere solcher Näpfchen übereinander angebracht werden können. Durch

1) Ueber die Desinfection mit Chlor und Brom. Mittheilungen aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte Bd. II, 1884, S. 228.

schmale Gummiringe, r, wird ein Abgleiten vom Glasstabe verhütet. Der Glasstab selbst sitzt fest in einem Kautschukstöpsel, der genau die grosse centrale Oeffnung verschliesst. Das rechtwinklige, bis fast auf den Boden reichende Glasrohr, cc, führt das nach den Regeln der Chemie im Apparate C entwickelte Gas in den Glasballon, dessen Temperatur durch das Thermometer, t, gemessen wird. Durch das dicht unter der Kappe endigende Glasrohr b kann zur Untersuchung jederzeit Gas entnommen werden, wenn man den Aspirator D in Thätigkeit setzt, mit dem man abgemessene Volumina Luft entnehmen kann. Das Gas wird in B durch eine Absorptionsflüssigkeit geleitet, in der der Gehalt des abgesaugten Luftvolumens an Gas maassanalytisch bestimmt wird.

Um den Einfluss der Gase auf Bakterienvegetationen qualitativ zu studiren, kann man nach Buchner[1]) in das mit der Bakterienkultur beschickte Reagirglas oder Kölbchen mit Hilfe eines Drahtes ein Miniatur-Reagirgläschen mit dem Desinfectionsmittel einhängen. Für derartige Fälle eignet sich auch der Apparat Fig. 52, S. 370, bei dem man nur den durch die Gummiverbindung g angefügten Aufsatz G, Lp weglässt. Man saugt dann durch a_1 die Bouillonkultur in den Schenkel S_1 und schmilzt a_1 wieder zu; ebenso saugt man durch a_2 das Desinfectionsmittel in den Schenkel S_2 und verschliesst auch a_2 wieder. Wenn man dann bei H zuschmilzt oder ein über H geschobenes Gummirohr abklemmt, müssen die von S_2 entweichenden Gase den ganzen Innenraum erfüllen.

Bei Desinfectionsversuchen in Flüssigkeiten und Gasen setzt man das an Fäden angetrocknete sporenfreie und sporenhaltige Material theils frei der Einwirkung dieser Medien aus, um den unmittelbaren Effect rein zu beobachten. Zu anderen Versuchen verpackt man das Material in Fliespapier, in ausgehöhlte Kartoffeln etc., um die natürlichen, erschwerenden Bedingungen nachzuahmen.

Um den Einfluss der Trockenheit der Luft, des

Austrocknens

zu studiren, bringt man einen Tropfen Kulturflüssigkeit mit Bakterien auf ein sterilisirtes Deckglas, lässt den Tropfen, gegen Staub ge-

---

[1]) Centralblatt für Bakteriologie 1887. II, No. 12.

schützt, an der Luft oder im Exsiccator eintrocknen, dann bringt man nach Stunden oder Tagen und Wochen einen Tropfen sterilisirter Bouillon auf das eingetrocknete Präparat und legt das Deckglas mit dem hängenden Tropfen in eine feuchte Kammer. Oder man giebt das Deckglas mit seiner angetrockneten Schicht in ein Kölbchen mit Bouillon, wobei man oft vortheilhaft das Deckglas in kleine Stückchen zerbricht. Oder aber mau trocknet das Material an Fäden an und bringt von Zeit zu Zeit solche Fäden in Bouillon, oder auf Agar oder Kartoffeln.

Die durch das Eintrocknen herbeigeführte Erschöpfung des Nährbodens macht sicht unter sonst günstigen Bedingungen auf endospore Bakterien dadurch bemerkbar, dass dieselben in den Fäden resistente endogene Sporen bilden, welche selbst nach Monaten bei Zusatz der Nährlösung wieder auskeimen. Wenn die sonstigen Bedingungen aber zur Bildung von Dauerformen nicht genügen oder wenn es sich um Bakterien handelt, welche keine gegen die Trockenheit sehr resistente Sporen bilden, dann wirkt das Austrocknen in einiger Zeit gleichzeitig tödtend, so dass später bei Zusatz der Nährlösung kein Auskeimen dieser Bakterien mehr eintritt.

Die Einwirkung hohen Druckes

auf die Bakterien ist nur mit besonderen Apparaten zu studiren. Bis jetzt gehen die Angaben noch derart auseinander, dass ich mich mit Andeutung dieses Gebietes begnügen muss. Der Wunsch, dass auch diese Seite der Methodik bald etwas besser bearbeitet wird, ist begründet durch die Angabe der Existenz aërobiotischer Bakterien in beträchtlichen Meerestiefen und durch die Resistenz von Bakterien gegen entsprechenden künstlich hervorgerufenen Druck bis zu 1000 Atm.[1]). Hierher gehören auch die Angaben von Chauveau und Wossnessenski[2]), dass Drucksteigerung erst abschwächend und bei gewisser Höhe tödtend auf Milzbrandbacillen wirkt. Um geringere Druckschwankungen zu beobachten, kann man sich des Klebs'schen Apparates S. 356 bedienen.

[1]) Certes, Comptes rendus, Bd. 98, S. 690 und 745, Bd. 99, S. 385.
[2]) Comptes rendus, Bd. 98, S. 314.

Die Electricität

ist nach Cohn und Mendelsohn[1]) in Form der physiologisch wirksamen Inductionsströme auf Bakterien in Flüssigkeiten ohne Wirkung. Die Wirkung des constanten Stromes auf die Vermehrung von Bakterien sowohl in Nährlösungen, als auf die Entwickelung von Mikrokokkus prodigiosus an der Oberfläche von Kartoffeln hing ab von der Stromstärke und war zurückzuführen auf die electrolytische Wirkung des Stromes.

Die Phosphorescenz

der Bakterien ist durch die zuerst Fischer[2]) gelungene Reinkultur einiger Arten dem Experimente zugänglicher geworden. Eine Ergänzung brachte auch Forster[3]) und Ludwig, der schon früher[4]) unsere Kenntnisse über die photogenen Mikroorganismen gefördert und die Phosphorescenz durch einen Mikrospectralapparat zu bestimmen versucht hatte, gab eine gute Zusammenfassung[5]), auf die ich verweisen muss. Die Bestimmung erfolgt am besten mit dem von Engelmann angegebenen, von Zeiss construirten Mikrospectro-Photometer, der aber nicht zu den überall zugänglichen Hilfsapparaten gehört.

Nach Fischer und Forster ist die Phosphorescenz im Dunkeln so stark, dass man durch Auflegen der Gelatineplatten auf photographische Platten oder lichtempfindliches Papier die Colonien dieser photogenen Bakterien sich selbst photographiren lassen kann; diesen einfachen überraschenden Versuch kann man natürlich in jedem Laboratorium machen. De Giaxa[6]) hat gezeigt, dass die Veränderungen, der Durchsichtigkeit der Gelatine sich zum Selbstphotographiren aller Bakterien verwenden lassen, wenn man die Platten auf lichtempfindliches Papier legt und dem Sonnenlichte aussetzt.

---

1) Beiträge zur Biologie. Bd. III, Heft 1, S. 141.

2) Zeitschrift für Hygiene 1887, II, S. 54; Centrallblatt für Bakteriologie 1888, Bd. III, No. 4.

3) Centralblatt für Bakteriologie 1887, II, No. 12.

4) Zeitschrift f. wissenschaftl. Mikroskopie 1884, I, S. 181.

5) Centralblatt für Bakteriologie 1887, II, No. 13—14.

6) ibid. 1888, III, No. 22.

Engelmann[1]) fand, dass die Schwärmbewegungen des bakterium photometricum abhängig sind

vom Lichte[2])

und dass im Sonnenspectrum die Ansammlung der Zellen am stärksen im Ultraroth ist und durch Grün und Blau nach dem Violett hin immer mehr abnimmt.

Engelmann[3]) hatte gefunden, dass die Zerlegung der Kohlensäure nicht nur durch den grünen Farbstoff des Chlorophyll, sondern auch durch blaugrüne, gelbgrüne, gelbe, braune und rothe Farbstoffe erfolgt und dass die Assimilation mit der Absorption parallel geht. Weiter ermittelte er[4]), dass die Purpurbakterien vermittelst des Bakterio-Purpurin, einem ächten Chromophyll, im Lichte Sauerstoff ausscheiden. Hierzu kann man sich verhältnissmässig bequem nach Hoppe-Seyler[5]) und Engelmann des defibrinirten, durch einen Wasserstoffstrom venös gemachten Blutes bedienen, dessen venöse Farbe durch den Sauerstoff, welche in ihm befindliche chromophyllhaltige Zellen bilden, bei Beleuchtung hellroth wird. Auch hierzu und zu der „Bakterienmethode“ von Engelmnann, bei der man die Empfindlichkeit verschiedener Bakterienarten. besonders einiger Schraubenbakterien, gegen Wechsel der Sauerstoffspannung und die Sauerstoffgier einiger zur Gruppe des b.-termo gehörigen Fäulnissbakterien ausnutzt, bedarf man des Engelmann'schen Mikrospectralapparates.

Das diffuse Tageslicht ist nach den bisherigen Erfahrungen ohne Einfluss auf das Wachsthum vieler Bakterien, nur für Streptokokkus ochroleukus wurde von Prove ermittelt, dass er bei völliger Dunkelheit kein Pigment bildet, sondern das gelbe Pigment nur bei diffusem Tageslicht und directem Sonnenlicht entwickelt. Ebenso erfährt das Wachsthum bei einigen höheren Arten, wie Beg-

---

1) Archiv f. d. ges. Physiologie 1883. Bd. 30, S. 95.

2) Eine zusammenhängende Darstellung findet sich bei Raum: Zeitschrift für Hygiene 1889, VI, S. 312.

3) Botanische Zeitung 1887, S. 394.

4) Archiv f. d. ges. Physiologie 1888, Bd. 42, S. 183.

5) Zeitschrift f. physiologische Chemie, Bd. II, S. 425.

giatoa roseo-persicina, schon nach früheren Beobachtungen von Lankaster und Zopf eine Begünstigung durch das Licht. Da diese Arten ebenso, wie das bakterium photometricum, zur Gruppe der Purpurbakterien gehören dürften, erklärt sich dieses Lichtbedürfniss aus dem vorher Gesagten von selbst.

Nach Downes und Blunt, Tyndall, Jamiesson und in der letzten Zeit nach Untersuchungen von Duclaux[1]) und Arloing[2]) wirkt das directe Sonnenlicht auf nicht sporenbildende Bakterien in kurzer Zeit, auf Sporen in längerer Zeit schwächend und schliesslich tödtend, wenn die geimpften Nährlösungen jeden Tag einige Zeit der Sonne ausgesetzt werden. Die Insolation wird deshalb von diesen Autoren als ein wichtiger hygienischer Factor betrachtet.

Nach Duclaux[3]) erfahren manche Nährlösungen unter dem Einflusse der Insolation tiefgehende Zerlegungen. Nach Ritsert[4]) wird reines Fett durch den Sauerstoff der Luft oxydirt, ranzig, aber nur dann, wenn gleichzeitig Licht zutritt; Licht ohne Luftzutritt bewirkt diese Oxydation nicht. Deshalb ist bei den Versuchen über Insolation die chemische Veränderung des Substrates mit zu berücksichtigen und ausserdem zu beachten, dass durch Insolation die Temperatur der Substrate so erhöht werden kann, dass diese Temperatur allein schon zum Beeinträchtigen oder Vernichten des Bakterienwachsthums genügt.

Die von Globig ermittelte Thatsache, dass sich gerade in den oberen Bodenschichten Bakterienarten finden, welche zwischen 50 und 70° zu wachsen vermögen, darf wohl als eine Anpassung an die Insolation des Bodens aufgefasst werden.

---

[1]) Comptes rendus, 1885, Bd. 100, S. 119; Bd. 101, S. 395.

[2]) ibid. 1885, Bd. 100, No. 6; Bd. 101, No. 8 und 9; Bd. 104, No. 10.

[3]) Comptes rendus, 1886, Bd. 103, No. 19; Bd. 104, No. 5.

[4]) Dissertation 1890.

14. Die Infections-Methode.

Bei dem höchsten, als streng obligater Parasitismus bezeichneten Grade der Anpassung an die parasitische Lebensweise scheinen a priori nur die Gewebe des thierischen oder pflanzlichen Organismus den Parasiten die nöthigen Existenzbedingungen zu bieten und in manchen extremen Fällen scheint nur eine ganz bestimmte Art oder selbst nur eine bestimmte Varietät den Parasiten als Wirth dienen zu können. Derartige Beobachtungen führten dazu gesunde Thiere und Pflanzen der für die Parasiten empfänglichen Arten künstlich mit denselben zu inficiren, so dass dann der künstlich inficirte Organismus diese Parasiten unter reinen Bedingungen enthielt. Ich erinnere nur an die grundlegenden Versuche von Bassi über die Muscardine genannte Krankheit der Seidenraupen, an Küchenmeister's Experimente „über die Metamorphose der Finnen in Taenien," an die bekannten Experimente über Trichinose von Leukart, Zenker, Virchow, an die Infectionen von Pflanzen mit Pilzen von de Bary, van Tieghem und von Brefeld, welcher letztere die Aufgabe der Infectionsmethode dahin präcisirte [1]), „erstens zu ermitteln wo und wie die Pilzkeime eindringen, dann zweitens die Entwicklung des Pilzes und das Fortschreiten der typischen Erkrankung der Wirthe von den eingedrungenen Pilzkeimen lückenlos herzuleiten."

Man umgeht durch das Thierexperiment die Schwierigkeit, dass die betreffenden Parasiten in künstlichen Nährsubstraten vielleicht nicht wachsen, und erreicht in dem Blute oder Gewebe der Thiere resp. Pflanzen zunächst relativ reine Massenkulturen und nach einigen Uebertragungen völlig reine Kulturen.

Die sowohl durch klinische Beobachtungen, durch Thatsachen der Epidemiologie als vielfache Experimente festgestellte Uebertragbarkeit vieler Infectionskrankheiten führte dann, nachdem man manche dieser Krankheiten in Beziehung zu Bakterien zu bringen gelernt

---

1) Die künstliche Kultur parasitischer Pilze. Botanische Untersuchungen über Hefenpilze, Bd. V, 1883, S. 1.

hatte, dazu die Infectionsmethode auch auf die Bakterien anzuwenden. Wir müssen streng genommen hierbei zwei Dinge auseinanderhalten. Einmal die Uebertragung anderweitig gewonnener Reinkulturen auf Thiere zum Nachweise der malignen Eigenschaften dieser Bakterien, und zweitens die Uebertragungen von Thier zu Thier ohne anderweitig vorausgegangene Reinkulturen. Es wurden früher meist, aber selbst oft jetzt noch, zu solchen Infectionen beliebige Thierspecies verwendet, welche gerade im Laboratorium zur Hand waren. Da ermittelte Koch[1]), dass bei Uebertragung von Faulflüssigkeiten auf Feld- und Hausmäuse nur die letzteren an einer bestimmten, durch feine Bacillen bedingten Septikämie zu Grunde gingen, und dass nach einigen Uebertragungen von Maus zu Maus das Blut dieser letzteren eine tadellose Reinkultur dieser Bakterienart darstellte. Gerade umgekehrt sind nach Löffler[2]) die Hausmäuse für Rotz unempfindlich, während die Feldmäuse für diese Krankheit ungemein empfänglich sind. In ähnlicher Weise ermittelte Koch durch Uebertragung von anderen Faulflüssigkeiten auf Kaninchen, dass bei diesen nach wenigen Uebertragungen von Thier zu Thier alle übrigen, ursprünglich in der Flüssigkeit reichlich vorhandenen Bakterien eliminirt waren und dass das Blut eine Reinkultur einer einzigen Bakterienart darstellte. Milzbrandbacillen tödten Mäuse so absolut sicher, dass man durch Uebertragung von Bakteriengemengen, welche Milzbrandbacillen enthalten, auf Mäuse nach wenigen Uebertragungen diese Bakterien rein erhalten kann. Ferner gelang es Carter und Koch Affen mit Recurrensblut zu inficiren, derart, dass das Blut dieser Thiere Reinkulturen der Recurrens-Spirochäten repräsentirte.

Aus derartigen Ermittelungen leitete Koch das wichtige Postulat her, zu Infectionsversuchen zunächst solche Thierspecis zu verwenden, welche nachweislich empfänglich für die betreffende Krankheit sind, also Thiere derselben Art, und bei nicht Ausführbarkeit dieses Postulats zuerst

---

1) Untersuchungen über die Aetiologie der Wundinfectionskrankheiten 1878. Zur Untersuchung von pathogenen Organismen. Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte, Bd. I, 1881, S. 1.

2) Arbeiten a. d. K. Gesundheitsamte, 1886, I, S. 141.

Species zu wählen, welche der Thierart nahe stehen, bei der die Krankheit spontan auftritt. Bei der Schwierigkeit diesem Postulat gerecht zu werden, bleibt es wünschenswerth, unter den kleineren, leicht zugänglichen Thieren die empfindlicheren für möglichst viele Krankheiten zu ermitteln. Die Technicismen folgen bei den Uebertragungsversuchen.

Diese Infectionsmethode als Methode der Reinkultur, bei der das Blut oder Gewebe des absichtlich inficirten Organismus eine Reinkultur der infectiösen Mikroorganismen darstellt, ist bei allen den Bakterien ins Auge zu fassen, welche den höchsten Grad der parasitischen Adaption zeigen, und bei allen den Infectionskrankheiten, bei denen bis jetzt Mikrobien noch nicht nachgewiesen sind, welche aber nach ihrem klinischen und epidemiologischen Verhalten als contagiöse Krankheiten aufzufassen sind. Bei einzelnen dieser Krankheiten, bei vielen acuten Exanthemen, scheinen aber selbst derartige Uebertragungen ganz aussichtslos, weil diese Krankheiten möglicherweise ganz ausschliesslich den Menschen befallen, weil bei denselben die supponirten Mikroorganismen nur noch im menschlichen Körper die Existenzbedingungen finden. In solchen Fällen ist natürlich die Lösung aller der früher S. 384 gestellten Fragen unmöglich, und es würde unbillig sein von der bakteriologischen Forschung hier die Lösung von Aufgaben zu verlangen, welche der Natur der Sache nach unlösbar sind.

In diesen Fällen müssen aber die lösbaren Theile der Aufgabe um so gewissenhafter ermittelt, die klinischen und epidemiologischen Beobachtungen um so kritischer gesichtet werden.

Aber der Bakteriologe darf erst auf die Lösung aller Aufgaben verzichten, wenn wirklich alle Möglichkeiten erschöpft sind. Eine Verbesserung der Methoden gestattet bisweilen scheinbar unmögliche Aufgaben noch lückenlos zu lösen, wie Koch's Ermittelung der Aetiologie der Tuberkulose lehrt, bei welcher das Experiment, trotz des scheinbar höchsten Grades parasitischer Adaption, Reinkulturen ausserhalb des thierischen Organismus herzustellen gestattete.

Die Infectionsmethode als Methode der Reinkultur erfordert in der Regel die Wahl sehr empfänglicher Thiere, z. B. Feld-

mäuse und Meerschweinchen für Rotz, Meerschweinchen für Tuberkulose, weisse Mäuse für Schweinrothlauf, Hunde und Kaninchen für Tollwuth, Meerschweinchen für malignes Oedem und Rauschbrand, Kaninchen für Wildseuche und Hühnercholera. Oft ist es aber wünschenswerth weniger empfängliche Thiere zu wählen, z. B. Ziesel oder Hund für Tuberkulose, Kaninchen für Schweinrothlauf, weil in Folge des langsamen Verlaufes manche Besonderheiten eintreten, welche bei acutem Verlaufe ausbleiben.

---

15. Die Uebertragungsversuche bei parasitischen Bakterien.

Durch die Uebertragung von Reinkulturen auf empfängliche Thiere wird direct der Nachweis geführt, dass die bei einem Krankheitsprozesse vorkommenden Mikroorganismen wirklich die Erreger der betreffenden Infectionskrankheit sind. Die anderen Methoden zur Erforschung der Aetiologie, auch die experimentell arbeitende localistische Forschung, kommen alle nur bis zu diesem Punkte. Hier ist vorläufig ihren Methoden ein Ziel gesetzt. Auch die mit grossen Zahlen arbeitende Statistik muss hier Halt machen, ganz abgesehen davon, dass bei der Verwerthung auch grosser Zahlen der Werth der Schlüsse sehr davon abhängt, wie die Zahlen gewonnen wurden, so dass dasselbe Zahlenmaterial wiederholt schon mit derselben Entschiedenheit bald für Grundwassertheorie, bald für Trinkwassertheorie, bald zur Erklärung einer Krankheit als contagiöser Natur, bald als Bodenkrankheit herangezogen worden ist.

Es würde nichts Verkehrteres geben als die Bedeutung der auf das Studium dieser Fragen gerichteten ätiologischen Forschung, welche gerade für das praktische Handeln bei Versagen anderer Angriffspunkte oft brauchbare Anhaltspunkte giebt, herabzusetzen. Aber ebenso unrichtig ist es die Ergebnisse dieser Richtung als

die allein maassgebenden hinzustellen und das Thierexperiment als nichts beweisend für die natürliche Art der Infection anzusehen. Es dürfte gut sein, wenn man sich hin und wieder der oft recht grossen Schwächen der Methoden erinnert, mit denen die anderen Forschungsrichtungen in der Aetiologie arbeiten müssen, bei denen die Sicherheit der daraus gezogenen Schlüsse oft recht grell mit der Unsicherheit des Beobachtungsmaterials constrastirt.

Aber auch bei den Thierexperimenten hat man sich vor Einseitigkeiten zu hüten. Der Experimentator, welcher im Besitze empfänglicher Thiere das Experiment vollständig beherrscht, verfällt leicht in den Fehler zu einseitig contagionistisch zu denken und aus seinen Versuchen für den natürlichen Infectionsmodus zu viel zu schliessen, auch da, wo seine Versuche ihrer Natur nach unabgeschlossen geblieben sind.

Die Aufgabe des Thierexperimentes ist aber in Wirklichkeit eine zweifache, wobei allerdings eine Strenge Scheidung kaum durchführbar ist. Einmal ist überhaupt durch directe Uebertragungsversuche zu ermitteln ob eine Bakterienart pathogen ist oder nicht, ob sie Erreger einer Krankheit oder ein zufälliger Begleiter ist.

Durch Uebertragungen auf möglichst viele Arten von Versuchsthieren ist zu ermitteln, ob sie nur für die eine Thierspecies maligne Eigenschaften entfaltet, bei der sie spotan beobachtet wurde, oder ob sie auch für andere Thiere pathogenetisch ist. Die Beantwortung dieser Frage ist zur Ermittelung der Verbreitungsmöglichkeiten einer Infectionskrankheit höchst wichtig.

Durch diese Versuche ist gleichzeitig zu ermitteln ob die Bakterien bei der künstlichen Infection sich ebenso wie bei der spontanen Erkrankung im Körper in einer Verbreitung und Anordnung vorfinden, welche alle klinischen Symptome und pathologischen Befunde zwanglos erklärt.

Zweitens ist zu versuchen den Modus der Infection möglichst zu erreichen, den wir aus klinischen, pathologisch-anatomischen und allgemein epidemiologischen Ermittelungen als den Modus der natürlichen

Infection bei spontanem Eintritt einer epidemischen Krankheit annehmen.

Schon hieraus geht hervor, dass wir selten in der Lage sind aus bakteriologischen Erfahrungen allein die Aetiologie einer Infectionskrankheit zu construiren. Alle derartige Versuche sind bis jetzt gescheitert und die Fortschritte der Bakteriologie haben in der Regel selbst die Berichtigungen der früheren Einseitigkeiten gebracht. Die klinischen, anatomischen und epidemiologischen Beobachtungen sind auch ächt naturwissenschaftliche Beobachtungen und müssen ebenso gewissenhaft zu Rathe gezogen werden, wie das Thierexperiment mit seinen anders gearteten Irrthumsmöglichkeiten.

Versuche am Menschen selbst sind vor langer Zeit von Fallopia zu Pisa mit Giften an zum Tode verurtheilten Verbrechern gemacht worden. In neuerer Zeit hat Moczutkowski Recurrensblut erfolgreich auf Menschen übertragen; Arning impfte einen zu Tode verurtheilten Verbrecher mit Lepra; Buchner machte an sich und seinen Schülern erfolgreiche Impfungen mit entzündungserregenden Bakterien-Proteïnen. Im Allgemeinen jedoch sind für uns Versuche am Menschen, mindestens Infectionen, ausgeschlossen und doch werden tagtäglich Beobachtungen an Hunden oder Meerschweinchen kritiklos auf den Menschen übertragen. Nicht jede menschliche Krankheit ist auf Thiere übertragbar oder die etwa empfängliche Thierspecis ist uns unbekannt. In derartigen Fällen ist es bisweilen durch ganz besondere Anordnungen des Versuches gelungen doch noch Thiere zu inficiren, aber was derartige gekünstelte Uebertragungen für die natürliche Infection beim Menschen beweisen sollen, hat noch Niemand verrathen. Wohl aber kann man durch derartige Versuche manche allgemeine Eigenschaften der Parasiten kennen lernen, welche uns über die Biologie neue Aufschlüsse geben.

In anderen Fällen liegt es so, dass die Infection nur an grösseren Thieren in natürlicher Weise vorgenommen werden kann, z. B. bei den Infectionskrankheiten unserer Heerdthiere. Aber diese Versuche sind sehr kostspielig und dienen mehr zu einem gewissen formalen Abschlusse anderer Versuchsreihen.

Hat man für einzelne Krankheiten empfängliche Thiere gefunden, so ist zu berücksichtigen, dass der Infectionsmodus für diese

Thiere durchaus nicht derselbe sein muss, wie für den Menschen oder grössere Heerdthiere. Die Zahl der Keime, welche für eine Infection in minimo nöthig ist, wird in der Regel gar nicht beachtet und zweifellos werden meist viel grössere Mengen verwerthet als bei den spontanen Infectionen in Frage kommen. Die Zahl der zur Infection nöthigen Keime kann aber bei verschiedenen Thierspecies sehr schwanken und umgekehrt können Differenzen in der Zahl der Keime den Infectionsmodus beeinflussen.

Bei anderen Mikroparasiten hat man zu beachten, dass sie nur für bestimmte Species infectiös sind und, auch in geringer Zahl übertragen, die Krankheit bei gesunden Thieren auslösen, während auf andere Thiere eine grössere Zahl Keime übertragen werden muss; schliesslich existiren Thiere, bei denen durch die lebend übertragenen Mikroorganismen gar keine Infection zu Stande kommt, sondern bei denen nur die übertragenen Stoffwechselprodukte giftig und tödtlich wirken. Dies verknüpft die pathogenen Bakterien phylogenetisch unmittelbar mit denjenigen gewöhnlichen Saprophyten, welche selbst für Thiere nicht infectiös sind, welche aber bei der Eiweissspaltung, der Fäulniss, giftig wirkende Stoffwechselprodukte bilden.

Bei manchen Infectionskrankheiten beobachten wir, dass gleichzeitig oder nacheinander zwei Mikroparasiten ein Individuum befallen und diese Mischinfectionen und Nachkrankheiten sind noch besonders zu beachten, weil sie das epidemiologische Verhältniss noch unklarer machen und für die Therapie neue, complicirtere Aufgaben stellen.

Die toxischen Substanzen, welche Saprophyten ausserhalb in flüssiger oder Gasform bilden, können einen gesunden Organismus oder für die Localisation wichtige Gewebe und Zellterritorien schwächen und dadurch eine Infection begünstigen. Solche Stoffwechselprodukte spielen bei älteren Kulturen eine Rolle, so dass es nicht einfach genügt die Bakterienkulturen zu übertragen, sondern dass man auch das Alter der Kulturen besonders bachten muss um klar zu stellen, ob eine reine Infection oder eine mit Intoxication gemischte und dadurch begünstigte Infection vorliegt. Aehnlich können auch mechanische Verletzungen der Gewebe wirken.

Im Innern des Körpers können in ähnlicher Weise normale basische Stoffwechselprodukte, die Leukomaïne, wenn sie pathologisch

vermehrt auftreten, die Disposition zu Krankheiten steigern und der Saprophytismus der Darmbakterien kann durch Abweichungen von der Norm in ähnlicher Weise zu einer Autointoxication oder Autoinfection führen, welche das Eindringen von Infectionserregern begünstigt.

Das Thierxeperiment giebt unter den gewöhnlichen reinen Bedingungen hierüber fast gar keinen Aufschluss und deshalb müssen wir die klinische, pathologisch-anatomische und epidemiologische Beobachtung ebenso hoch halten wie den bakteriologischen Thierversuch, und bei Differenzen ist es durchaus nicht von vornherein sicher, dass der Bakteriologe Recht und die Anderen Unrecht haben. Wohl aber kann man behaupten, dass der Thierversuch als wissenschaftliches Experiment in dem Rahmen, den ihm der Experimentator zuweist, gesetzmässig sein muss. Deshalb muss aber diese Grenze, welche dem Thierexperimente gesetzt ist, um so ängstlicher und gewissenhafter beachtet werden. Geschieht dies nicht, so darf man sich nicht wundern, wenn bisweilen selbst sogenannte epochemachende Entdeckungen in kürzester Zeit widerlegt werden. Galens Uebertragung der Anatomie des Affen auf den Menschen wurde erst durch Vesal beseitigt, die voreiligen Uebertragungen manches modernen Galen von Kaninchenexperimenten auf den Menschen haben kaum den Tag der Publikation überlebt und mahnen eindringlichst auf diesem dornenvollen Gebiete keine Einseitigkeiten zu begehen, und dies um so mehr, als die exacte klinische, pathologisch-anatomische und epidemiologische Beobachtung ebenso ächt inductive Naturforschung ist wie die bakteriologische Untersuchung.

Man kann folgende Methoden zur Infection anwenden:

Die Inhalationsversuche

stellt man derart an, dass man die Thiere in einen geräumigen Kasten bringt, dessen Luft Organismen beigemengt werden. Dies geschieht durch einen Dampfzerstäubungs-Apparat, oder weniger bequem durch einen Hand-Spray. Man lässt entweder den Apparat kürzere Zeit, 20 Minuten bis 1 Stunde, wirken und verwendet dann eine stärkere Suspension von Reinkulturen in sterilisirtem Wasser, oder man lässt die Zerstäubung länger andauern

und vertheilt dann die Bakterien in entsprechend grösseren Wassermengen. Zur Vermeidung von Gefahren hat sich der Operateur in einer grösseren Entfernung zu halten durch Einschaltung eines längeren Gummischlauches, event. unter Verwendung einer durch mehrfache Lagen Filtrirpapier gebildeten Maske vor Mund und Nase. Kann man das Thier, z. B. eine Maus, in einem engen Raume, einer Röhre z. B. so unterbringen, dass es sich nicht wenden kann, so dirigirt man die zerstäubten Massen direct gegen das Maul des Thieres.

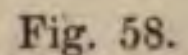


Fig. 58.



H. Buchner[1]) hat in der letzten Zeit die Technik der Inhalationen wessentlich verbessert. Bei directer Anwendung des Spray wurden die Thiere durchnässt und mit Impfmaterial geradezu über-

[1]) Archiv f. Hygiene 1888, VIII, S. 145. Centralblatt für Bakteriologie 1889, VI, No. 10.

schüttet. Buchner brachte deshalb den Spray in einer Woulff-schen Flasche, Fig. 58 A, unter, welche mit Hülfe des Gummibandes G mit dem eisernen Gefässe B fest verbunden wurde. Durch den einen Gummipfropf a, welcher zwei Durchbohrungen hat, führt die eine Röhre zu dem Aufnahmegefäss fl für die zu zerstäubende bakterienhaltige Flüssigkeit; durch den Trichter tr kann nach Oeffnen der Klemme im Verlaufe des Versuches wieder Flüssigkeit nachgefüllt werden. In der anderen Durchbohrung steckt das Glasrohr l, welches mit dem Gebläse G versehen ist und innerhalb der Flasche zum Spray z führt, dessen Strahl senkrecht in die Flasche aufsteigt. Durch das im anderen Gummipfropf b steckende Glasrohr geht nunmehr nicht ein directer Sprühstrahl, sondern nur ein feiner Nebel, welcher die Keime der Luft des Kastens K in einer Form beimischt, wie Keime auch unter natürlichen Verhältnissen in der Luft suspendirt sein können. Das Thier wird nicht nass und kann die relativ sehr wenigen Keime wirklich einathmen, während bei directem Spray das Verschlucken kaum schwerer als das Einathmen erscheint. Später hat Buchner diesen Apparat noch compendiöser gestaltet, indem er den Sprühapparat am Boden eines grossen Reagensglases anbrachte, welches mit einem doppelt durchbohrten Gummipfropf versehen ist, dessen eine Durchbohrung das mit dem Handgebläse armirte zum Sprühapparat führende engere Glasrohr trägt, während die zweite Durchbohrung von einem etwas weiteren, unter dem Pfropf endigenden Rohre durchsetzt ist, durch welches die bakterienhaltige, feuchte Luft (Nebel) austritt.

Zum Inhaliren von trockenen Pilzsporen durch Tauben brachte Schütz[1]) die trockenen gepulverten Sporen auf den Boden eines Glases, in dem eine Taube bequem stehen konnte, vertheilte die Sporen durch wiederholtes Schütteln in der Luft des Glases, welches durch Watte nach aussen abgeschlossen worden war.

H. Buchner brachte den Käfig D, Fig. 59, welcher die Thiere enthielt, auf das Drahtgestell C in eine Glasglocke A, welche durch den Gummiring G mit dem Trichter B verbunden ist. Durch die

---

1) Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte, 1884, Bd. II S. 217.

Röhre b wird das staubförmige Versuchsmaterial auf den Grund des Trichters B gebracht und, nach Verschluss dieser Röhre mit einem Gummipfropf, durch ein Gebläse, welches mit der Glasröhre a verbunden wird, aufgewirbelt und der Athmungsluft im Raume A beigemischt. Da das staubförmige Material sich an den Glaswänden ansetzt, muss man es von Zeit zu Zeit durch Klopfen an die Gefässwand wieder zum Sinken bringen, um es wieder aufwirbeln zu können.

Fig. 59.



Da bei der natürlichen Infection durch die Athmung die Dauerkeime eine grosse Rolle spielen, ist hierauf in den Experimenten Rücksicht zu nehmen, und manche der Differenzen über Erfolg und Nichterfolg sind wohl hieraufzurückzuführen. Bei Milzbrand bewirken nach H. Buchner die Sporen eine Allgemeininfection, die Bacillen dagegen eine heftige Pneumonie. Zur Erzielung der Inhalationstuberkulose durch tuberkulöse Sputa verreibt man nach Veraguth[1]) 10 gr eitriges tuberkulöses Sputum mit der 50 fachen Menge Wasser, filtrirt diese Suspension zur Entfernung von Beimengungen, welche an und für sich eine mechanische oder chemische Reizung des Lungengewebes verursachen könnten, durch zwei dichte Flanelllappen oder nach Weichselbaum[2]) durch entfettete Baumwolle.

---

[1]) Experimentelle Untersuchungen über Inhalations-Tuberkulose. Arch. f. experim. Pathologie 1883, Bd. 17.

[2]) Wiener med. Jahrbücher 1883.

Bei Inhalation durch Trachealfisteln ist auf die Möglichkeit der gleichzeitigen Infection von der Wunde aus zu achten.

Will man sehen, welche Wirkungen Bakterien ausüben, welche auf irgend eine Weise in die Trachea gelangt sind, so kann man nach Küssner[3]) unter antiseptischen Cautelen die Trachea durch einen kleinen Schnitt freilegen und das Material durch eine feine Oeffnung mittelst einer Spritze in die Trachea bringen. Bei dem Einbringen in die Trachea wird gewöhnlich zu viel Material eingeführt, und in Folge dessen eine Pneumonie hervorgerufen, welche oft die Allgemeininfection verhindert.

In ähnlicher Weise können Infectionen von den Luftwegen aus, ohne directe reine Einathmung, durch Aspiration verschluckten Materials zu Stande kommen, die in höheren Graden deutlich in Form von Schluckpneumonien auftreten.

Aufnahme mit der Nahrung; Fütterungsversuche.

Bei der künstlichen Infection durch Fütterung muss man ausschliessen, dass durch rauhes, stachliges Futter möglicherweise Verletzungen der Schleimhäute eintreten können. Eine Infection von einer derartigen verletzten Stelle aus ist als eine Wundinfection in ihrem ganzen Effecte sowohl als in der Bedeutung für die Aetiologie des spontanen Entstehens anders aufzufassen als die Aufnahme von Infectionsmaterial durch die Nahrung ohne Verletzung der Schleimhäute.

Man streicht das Impfmaterial in der Regel einfach auf das Futter. Nach Koch, Gaffky, Löffler[4]) erreicht man, wenn man keine besondere Rücksicht auf die Reaction des Magensaftes nimmt, bei grösseren Thieren den Zweck am sichersten, wenn man von kleinen frischen Kartoffelwürfeln eine dünne Schicht so weit abspaltet, dass man sie deckelartig aufklappen kann. Dann höhlt man das Innere aus und füllt es mit dem rein kultivirten Bakterienmaterial, klappt den Deckel zu und bringt das präparirte Kartoffel-

---

[3]) Beitrag zur Impftuberkulose. Deutsche med. Wochenschrift 1883, No. 36.

[4]) Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte, 1884, Bd. II, S. 166.

stück auf die hintere Parthie der Zunge, so dass es ungekaut verschluckt werden muss. Kleine Würfel von hartgekochtem Eiweiss etc. kann man ebenso präpariren. Das Bakterienmaterial kommt dann bei Ausschluss jeder Verletzung der Schleimhäute in den Magen. Die bisherigen Versuche lehren, dass frische, sporenfreie Bakterien in der Regel oder doch häufig durch die Säure des Magensaftes vernichtet werden und nicht inficiren. Man muss deshalb die Versuche mit sporenfreiem und sporenhaltigem Material anstellen. Kleine Thiere, wie Ratten, Mäuse, kann man einigermaassen sicher zur Aufnahme einer bestimmten Nahrung nur zwingen, wenn man sie vorher etwa 24 Stunden hungern lässt; man giebt ihnen dann die Bakterien in einer Lieblingsnahrung, z. B. in kleinen Stückchen von süssen, gelben Rüben eingeschlossen.

Da nach den bisherigen Erfahrungen eine Begünstigung der Infection durch alle die Momente erwartet werden kann, welche der Säurebildung im Magen direct oder indirect entgegenwirken oder dieselbe umgehen, kann man versuchen bei Bakterien, welche keine endogenen Sporen bilden, oder sich nicht im Sporenzustande befinden, der hemmenden Wirkung des Magensaftes dadurch zu begegnen, dass man nach Nicati und Rietsch[1]) die Bakterien direct in das Duodenum injicirt. Diese Operation wird unter antiseptischen Cautelen mit sterilisirten und wieder abgekühlten Instrumenten und mit im Dampfe sterilisirter Watte und Seide ausgeführt. Das aufgebundene Thier wird mit einem Bogen durch Dampf sterilisirten Gummipapiers bedeckt, welches nur über der Operationsstelle eine Oeffnung hat. Die in dieser Oeffnung zu Tage liegende, in genügender Ausdehnung von den Haaren befreite und abgeseifte Bauchhaut wird mit 1 % Sublimatlösung gründlich abgewaschen, dann wird das Sublimat durch sterilisirtes Wasser wieder entfernt. Der Schnitt wird unter Verwendung eines Aetherspray in der linea alba etwas unterhalb des proc. xiphoideus angelegt. Nach Eröffnung des Peritoneum findet man schnell das Pylorusende des Magens, verfolgt dasselbe dem Netze entlang bis

---

[1]) Semaine méd. 1884, No. 38. Vergl. auch Deneke, deutsche med. Wochenschrift 1885, No. 3.

zum Duodenum. Dieses wird dann mit Pinzette fixirt und in der Längsrichtung desselben die von Koch modificirte, sterilisirte Pravaz'sche Spritze eingestochen und der Inhalt so injicirt, dass nichts in die Bauchhöhle gelangt. Ueber die Herrichtung der Spritze cfr. subcutane Injection. Dann wird das Duodenum in die Bauchhöhle reponirt, die Wunde durch dichte Nähte vereinigt und antiseptische Watte aufgelegt.

Da nach Ewald Wasser, welches mit Schlundsonde in den nüchternen Magen eingeführt wird, neutrale und selbst schwach alkalische Reaction annimmt und vor dem Auftreten saurer Reaction fast vollständig in etwa $1^1/_2$ Stunde in den Dünndarm gelangt, kann man die Versuchsthiere vor dem Verfüttern des sporenfreien Materials 24 Stunden hungern lassen und bringt bei grösseren Thieren die in sterilisirtem Wasser suspendirten Reinkulturen mit Schlundsonde direct in den nüchternen Magen; bei kleineren Thieren ist man auf den schlechten Willen derselben angewiesen und ein vorausgegangenes Hungern das einzige Mittel, um die Thiere ziemlich sicher zur Aufnahme der vorgesetzten Flüssigkeit zu bringen.

Da eine spontane Infection nicht nur durch die mit der festen Nahrung aufgenommenen Bakterien möglich ist, sondern auch durch die flüssige Nahrung, wie Wasser, Milch, so wird man in manchen Fällen die Reinkulturen in sterilisirtes Wasser oder Milch einbringen, die längere Zeit als Getränk dienen, ohne jedesmal vorausgehendes Hungern.

Als feststehend kann man annehmen, dass Magendarmkatarrhe eine Infection vom Verdauungsapparate begünstigen, zum Theil wohl weil sie die Säurewirkung des Magens paralysiren. Man kann deshalb versuchen, durch drastica einen Magendarmkatarrh hervorzurufen oder noch besser man hebt die Säurewirkung direct für einige Zeit auf. Diese erreichte Koch[1]) in folgender Weise, welche zunächst nur für Meerschweinchen gilt und für andere Thierspecies wahrscheinlich einiger Modificationen bedürfen wird. Die Säure-

---

[1]) Conferenz zur Erörterung der Cholera-Frage; 2. Jahrg. Berliner klin. Wochenschrift und deutsche med. Wochenschrift 1885, No. 37 ff. und Separatabdruck.

wirkung des Magens wird zuerst dadurch aufgehoben, dass dem Thier mit feiner Schlundsonde 5 ccm einer 5 % Lösung von kohlensaurem Natron eingeflösst wird. Zum bequemen Einführen der Sonde nimmt man ein kleines viereckiges Holzstück, welches in der Mitte zum Durchführen der Sonde durchbohrt ist und so gross sein muss, dass sich die Thiere darauf gut festbeissen können, so dass hindernde Bewegungen des Mundes und der Zunge fortfallen. Einige Zeit später (der Mageninhalt reagirt noch nach 3 Stunden alkalisch) wird die Suspension der Bakterien in Bouillon oder Wasser oder direct eine Reinkultur in Bouillon in derselben Weise eingeführt. Dies genügt bisweilen, aber nicht immer und es wird oft nach der Infection nöthig, noch eine Nebenwirkung hervorzurufen und eine zeitweilige Erschlaffung der Darmmuskulatur und Aufhebung der Peristaltik herbeizuführen. Dies erreichte Koch am sichersten durch eine Injection von Opiumtinctur in die Bauchhöhle, wobei auf 200 gr Gewicht des Thieres 1 ccm Opiumtinctur gerechnet wurden; die sich zunächst einstellende starke Narcose geht in ca. 1 bis 1½ Stunde vorüber; weniger sicher als Opium wirkten Alkohol, Chloral und Morphium. Bei anderen Thieren kann vielleicht das Narcoticum direct in den Magen oder subcutan beigebracht werden.

Kuisl[1]) machte einige Untersuchungen, nach welchen der normale Magensaft viele Bakterien schwächt, ohne sie immer zu tödten, so dass sie ohne die bis jetzt besprochenen Hilfsmittel vielleicht normaler Weise eliminirt werden, ehe sie eine Wirkung ausüben können, ohne dass man aber aus der nicht erfolgten Infection schliessen kann, dass sie im Magen auch wirklich getödtet waren. Bei der Kultur der Bakterien aus den Dejectionen ist zu beachten, dass die im Dünndarm vegetirenden Bakterien im Dickdarm durch die specifischen Fäulnissprodukte, bei Meerschweinchen vielleicht auch durch die sauere Reaction des Coecums, abgeschwächt und getödtet werden können. Man muss deshalb oft neben den directen Platten, die Dejectionen nach Schottelius und Gruber mit etwa der vierfachen Menge Bouillon mischen und sie ruhig 3 bis 5 Tage bei Zimmertemperatur

1) Aerztliches Intelligenzblatt 1885, No. 36 und 37.

stehen lassen. Dadurch finden etwaige Dauerformen, z. B. bei der Cholera asiatica, Zeit auszukeimen und man kann dann später und zwar trotz der Concurrenz mit den gewöhnlichen Bakterien der Darmfäulniss positive Resultate erzielen, wo die sofortigen Kulturen negativ ausgefallen waren. Noch sicherer ist es, wenn man nach der ersten derartigen vorbereitenden Kultur von der Oberfläche nach 3 Tagen eine Spur in frische Bouillon bringt und ev. nach 24 Stunden ebenso ein drittes Mal überträgt. Man kommt dann mit der einfachen Bouillon ebenso weit, wie Karlinski[1]) durch Verwendung einer Pankreasbouillon, mit deren Hilfe er aus eingetrockneten, 28 Tage alten Choleradejectionen die Kommabacillen kultivirte.

Die Aufnahme von Bakterien durch die **unverletzte Haut,** durch die Ausführungsgänge der Hautdrüsen, kann man nach Garrè[2]) durch Einreibung von Reinkulturen auf die vorher gereinigte Haut zu erreichen versuchen.

Experimentell besser beherrschbar als die Aufnahme durch Athmung, Nahrung und unverletzte Haut ist die Infection durch Verletzungen, welche streng genommen nur für die eigentlichen Wundinfectionskrankheiten verwerthet werden sollte. Diese Methoden haben sich wegen der Sicherheit und Brauchbarkeit zur Entscheidung vieler pathologischer Fragen ganz allgemein Eingang verschafft selbst dort, wo durch dieselben der Modus der spontanen Infection nicht nachgeahmt wird.

Die cutane Impfung

besteht in einer Verletzung der Oberhaut ohne Verletzung des subcutanen Gewebes, mit nachträglicher oder gleichzeitiger Application des Infectionsstoffes. Man bringt mit einem sterilisirten Messer eine leichte Verletzung der vorher von den Haaren entblössten Oberhaut an und streicht in diese flache Wunde mit einem Messer oder Platindraht eine Spur der Reinkultur oder der bakterienhaltigen Flüssigkeit ein. Statt dieses Operirens in zwei Zeiten kann man auch das Messer erst in

---

[1]) Centralblatt für Bakteriologie 1890. VIII, No. 2.

[2]) Fortschritte der Medicin 1885, No. 6.

die Reinkultur tauchen und den Schnitt gleich mit dem inficirten Messer machen.

Man wählt solche Stellen, an welchen die Thiere die Wunde nicht lecken können und welche ausserdem gestatten, den Prozess möglichst sichtbar zu verfolgen. Hierzu eignet sich vorzüglich das Ohr. Man macht an der inneren Fläche nicht weit von der Spitze oder an der vorderen Wurzel in die freie, den Knorpelrand begrenzende Haut einen nur wenige Millimeter tiefen, nicht blutenden Schnitt. Bei Mäusen gelingt fast nur an der Ohrwurzel und auch da noch schwer genug eine rein cutane Verletzung.

Auch die Impfungen der durchsichtigen Hornhaut, welche von Nassiloff[1]) und Eberth[2]) eingeführt wurden, kann man hierher rechnen. Man macht vom Hornhautrande her einen flachen Einstich in die Hornhaut, von dem aus die Bakterien in die Hornhaut in der sternartigen Form der sogenannten Pilzfigur hineinwuchern.

Auseinanderzuhalten von der ächten cutanen Impfung ist die

subcutane und intramuskuläre Application

der Bakterien. Man schneidet an einer von Haaren befreiten, gegen Lecken sicheren Stelle eine mit der Pinzette erhobene Hautfalte am Grunde ein und bildet mit stumpfer Sonde oder dem Messer eine Hauttasche. In diese Hauttasche streicht man mit sterilisirtem Messer oder Platinnadel von der Reinkultur ein und drückt dann die Haut wieder fest an. Bei Mäusen operirt man nach Koch[3]) am bequemsten derart, dass man die in einem grossen verdeckten Glascylinder sitzende Maus mit einer langen Pinzette am Schwanze fasst und den letzteren aus einem schmalen, für die Maus selbst nicht passirbaren Spalt zwischen Deckel und Glasrande soweit hervorzieht, dass man ihn mit der linken Hand gut fassen und halten kann. Dann macht man mit der Scheere in die verschiebbare Haut an der

---

1) Virchow's Archiv, Bd. 50, S. 550.

2) Bakterische Mykosen 1872.

3) Die Aetiologie der Milzbrandkrankheit. Beiträge zur Biologie der Pflanzen, II. Bd., 3. Heft, 1876, S. 279.

Schwanzwurzel einen flachen, quer verlaufenden Einschnitt, den man mit Sonde oder stumpfem Messer zu einer Tasche erweitert, in welche man mit Platindraht oder Messer eine Spur der Reinkultur einstreicht.

Zur subcutanen Injection dient eine von Koch[1]) angegebene, modificirte Pravaz'sche Spritze, welche durch Hitze sicher sterilisirt werden kann und zu diesem Zweck deshalb ohne Kautschuk hergestellt ist. Die Metallfassung ist mit dem Glascylinder durch ein in das Glas eingeschliffenes Schraubengewinde verbunden und diese Verbindung wird dicht gemacht durch ein kleines Kork- oder Asbestplättchen, welchers öfters erneuert wird. Der Stempel der Spritze wird mit Watte und Seidenfaden jedesmal frisch umwickelt, bis er fest schliesst. Die so hergerichtete Spritze wird 2 Stunden bei 150 bis 160° im Trockenschranke gehalten und gegen Staub geschützt abgekühlt. Vor dem Gebrauche wird der Stempel durch frisch sterilisirtes destillirtes Wasser angefeuchtet. Eine andere Form der Spritzen, welche gleichfalls von Koch angegeben ist, zeigt Fig. 60. Die Spritze besteht aus einem gläsernen Theile Gl, welcher an der oberen Oeffnung mit Watte geschlossen und für sich sterilisirt wird. Die Kanülen C werden ebenfalls für sich sterilisirt und passen unmittelbar auf die Glasröhre. Ein Stempel ist ganz vermieden und statt desselben dient ein Gummiballon G, dessen Fassung M genau auf den oberen Abschnitt der Glasröhre passt. Eine andere Modification hat Tursini[2]) angegeben, bei der gleichfalls der Stempel vermieden ist.

Fig. 60.

Weitere Modificationen haben Stroschein[3]), Petri[4]) und Tavel[5]) angegeben. Am handlichsten bleibt bis jetzt die altbe-

---

1) Mittheilungen I, 1881, S. 17.

2) Il Morgagni 1886, S. 88.

3) Mittheilungen aus Brehmer's Heilanstalt für Lungenkranke in Görbersdorf I, 1889, S. 279.

4) Centralblatt für Bakteriologie 1888, IV, No. 11.

5) ibid. 1889, V, No. 16.

währte Form der Pravaz'schen Spritze, wenn dieselbe an der Spitze nur in Glas gehalten ist, so dass die Kanüle genau auf die Glasspitze der Spritze passt, und wenn ein sterilisirbarer Stempel aus Asbest gewählt wird. Solche Spritzen werden in mehr oder weniger guter Ausführung schon an vielen Orten gefertigt.

Zum Injiciren dienen klare Bouillon- oder Blutserumkulturen oder frisch hergestellte Suspensionen der rein kultivirten Bakterien in sterilisirtem Wasser oder in 0,5 $^0/_0$ Kochsalzlösung.

Bisweilen muss man nach Durchtrennung der Haut das Material intramuskulär einbringen. Man macht entweder gleich mit inficirtem Skalpell einen Einstich in die Muskulatur oder man sticht mit sterilisirtem Messer ein und inficirt dann mit der Platinöse. Von Wichtigkeit kann auch das Einbringen von Bakterien in die vordere Augenkammer werden, besonders bei Arten, welche so langsam wachsen, dass die ersten sichtbaren Effecte in der Iris sich einstellen, wenn alle Entzündungserscheinungen schon beseitigt sind. Cohnheim und Salomonsen[1]) führten diese Methode für die Tuberkulose ein. Die Technik ist fast dieselbe wie bei der Iridectomie. Die linke Hand fasst mit einer Fixirpinzette eine Falte der Conjunctiva und dreht mit derselben den Augapfel nach unten, während ein Gehülfe den Kopf fixirt; bei einiger Uebung kann man sogar die Fixirpinzette entbehren. Die andere Hand sticht das schief nach Innen gerichtete Lanzenmesser dicht am oberen Rande der Hornhaut ein. Sobald die Spitze in der vorderen Kammer angelangt ist, senkt man den Stiel so, dass die Spitze gegen die Hornhaut gerichtet ist. In dieser Weise muss auch das Messer, sobald der Schnitt genügend gross ist, zurückgezogen werden, damit nicht wegen des abfliessenden Kammerwassers die nach vorn dringende Iris und Linse verletzt werden. Von in Wasser suspendirten Reinkulturen kann man einige Tropfen mit einer Spritze einführen, während man kleine Partikel bakterienhaltigen Materials mit einer Irispinzette einbringt.

---

1) Sitzungsberichte der Schlesischen Gesellschaft für vaterländische Kultur vom 13. Juli 1877 und Salomonsen: Om Indpodning af Tuberkulose, särligt i Kaninens Iris. Nordiskt Medicinskt Archiv 1878, Bd. XI, No. 12 und 19.

Zu Injectionen in Brust- und Bauchhöhle dienen suspendirte Reinkulturen, welche mit einer Spritze oder mit dem Trocart eingeführt werden.

Die Versuche über Hundswuth haben in den letzten Jahren zu vielen Versuchen über intracranielle Application der infectiösen Substanzen geführt. Man bedient sich hierzu eines Collin'schen Trepans, den Babes[1]) noch etwas modificirt hat. Das Blosslegen des Schädels muss selbstverständlich unter antiseptischen Cautelen geschehen. Nach Entfernung des Schädelstückes wird die dura mater gespalten und das Impfmaterial auf die Gehirnoberfläche schonend aufgestrichen oder in die pia mater eingetragen.

Zur directen Injection in die Blutbahn

wird das Gefäss (meist v. jugularis oder cruralis) unter antiseptischen Cautelen blossgelegt und die Kanüle oder Kapillare in der früher S. 229 geschilderten Weise eingebunden, aber so, dass möglichst wenig Blut ausfliesst. Die Unterbindung des verletzten Gefässes erfolgt in der gewöhnlichen Weise der Chirurgie, ebenso die Schliessung der Hautwunde. Bequemer ist es bei Kaninchen, eine directe Injection in die Ohrvene zu machen, welche bei diesen Thieren leicht zu treffen ist. Sollen grössere Mengen in die Ohrvene injicirt werden, so verwendet man eine Bürette, welche mit der Kanüle verbunden wird und auf welche oben eine Kautschukbirne aufgesetzt wird, mit der man die Flüssigkeit einpresst.

Während es im Allgemeinen bei directen Injectionen in die Blutbahn erforderlich ist, mechanische Störungen zu vermeiden und die Suspensionen der Reinkulturen von fremden Beimengungen zu befreien, kann es bisweilen wünschenswerth sein, etwas gröbere Partikel, kleine Stückchen vom festen Nährboden mit einzuführen, um zu sehen, ob etwa dadurch herbeigeführte mechanische Hindernisse, Thrombosen, die Localisationen der Bakterien zu beeinflussen vermögen. Bei Pilzsporen kann ein vorausgegangenes Quellen nach Ribbert[2]) die Localisation schon ändern, indem dieselben dann in

[1]) Centralblatt für Bakteriologie 1888, IV, No. 1.

[2]) Deutsche med. Wochenschrift 1885, No. 42.

Kapillargebieten haften bleiben, welche sie sonst passiren. Zur Injection in Blutbahn und seröse Höhlen ist es besser, die Suspension mit einer sterilisirten indifferenten Lösung von 0,5 % Kochsalz zu machen und nicht mit destillirtem Wasser.

Will oder kann man keine Uebertragungen mit Reinkulturen machen, sondern will man von Thier zu Thier impfen, so bleibt die Technik dieselbe, nur hat man bei der Entnahme des Materials so sorgfältig zu verfahren, als wollte man es zur Herstellung von Blutserum-Reinkulturen benutzen.

Wenn die malignen Eigenschaften einer reinkultivirten Bakterienart festgestellt sind, ist es wünschenswerth, annähernd die Minimalzahl der Bakterien zu kennen, welche eben zur sicheren Infection ausreichen. Oder bei nachgewiesener Virulenz einer infectiösen Flüssigkeit, des Blutes z. B., ist es wünschenswerth zu wissen, in welchem Grade der Verdünnung eine bestimmte Zahl Tropfen oder Theile eines Tropfens noch sicher inficiren. Aus derartigen Versuchen kann man fast unmittelbar Schlüsse für diesen Modus der natürlichen Infection unter spontanen Bedingungen ziehen. Bis jetzt liegen nach dieser Richtung nur ganz allgemeine Anhaltspunkte vor, welche ergeben, dass die unbedingt zur Infection erforderliche minimale Zahl der Bakterien bei verschiedenen Infectionskrankheiten schwankt und dass dieses Minimum in Beziehungen zur Körpergrösse und Empfänglichkeit der Thiere und zum Infectionsmodus steht. Für eine Form der Septikaemie ist diesem Postulate durch Davaine[1]), Koch[2]) und Gaffky[3]) eingehend Rechnung getragen und W. Cheyne[4]) hat ermittelt, dass bei subcutaner Injection ein Milzbrandkeim für Meerschweinchen, ein Bacillus der Mäuseseptikaemie für Mäuse zur Infection genügt, ebenso infectiös war Hühnercholera für Kaninchen, während für Meerschweinchen über 150 000 Keime erforderlich waren und bei weniger Keimen nur eine locale Affection eintrat.

---

1) Bulletin de l'Académie de médecine, Sitzung vom 17. Sept. 1872.

2) Untersuchungen über die Aetiologie der Wundinfectionskrankheiten 1878.

3) Experimentell erzeugte Septikaemie mit Rücksicht auf progressive Virulenz und accommodative Züchtung. Mittheilungen a. d. Kais. Gesundheitsamte, Bd. I, 1881, S. 50.

4) British Medical Journal 1886 vom 31. Juli.

Für die Pflanzenpathologie haben die Bakterien bis jetzt nur wenig Bedeutung gewonnen, vielleicht wegen der meist saueren Reaction der Pflanzengewebe. Reinke und Berthold[1]) gelang es, mit bakterienhaltiger Flüssigkeit aus einer nassfaulen Kartoffel gesunde Kartoffeln zu inficiren. Da die intacte Korkschicht einer gesunden Kartoffel vor der Infection schützt, muss man die Korkschicht durchtrennen. Man schneidet zu diesem Zwecke eine dreiseitige Pyramide mit scharfem Messer aus, bringt in diese Wunde ein Tröpfchen der Flüssigkeit oder eine Spur der Reinkultur und setzt das herausgeschnittene Stück wieder ein. Die geimpften Knollen kommen dann in eine feuchte Kammer. Nach Wakker[2]) ist die in Holland beobachtete sog. gelbe Krankheit der Hyacinthe durch Bakterien bedingt, welche als gelbe, schleimige Masse in den Gefässen der Zwiebeln und in den Gefässen und dem Parenchym der Blätter sich finden. Der directe Nachweis, dass diese beobachteten Bakterien die Ursache der Krankheit sind, würde noch durch Uebertragung auf gesunde Pflanzen zu bringen sein.

Nach Arthur[3]) ist eine in Amerika sehr häufige Krankheit der Birnbäume durch den Mikrokokkus amylovorus bedingt und Ad. Mayer[4]) hält Bakterien für die Ursache der Mosaikkrankheit der Tabakblätter.

---

16. Schutzimpfungen.

Litteratur.

Kitt: Werth und Unwerth der Schutzimpfungen gegen Thierseuchen. 1886.

Beumer: Der derzeitige Standpunkt der Schutzimpfungen. 1887.

Die Technik der Schutzimpfungen ist ganz dieselbe, wie die der Uebertragungen auf Thiere überhaupt. Die Herstellung von

---

1) Unters. aus dem botan. Laborat. in Göttingen, Heft I.

2) Bot. Centralblatt Bd. 14, S. 315.

3) American Naturalist 1885, S. 1177.

4) Landwirthschaftliche Versuchsstationen 1886, S. 451,

Impfstoffen geschieht theils durch die bereits besprochenen Agentien, welche auf die pathogenen Bakterien als Reiz wirken und je nach ihrer Intensität das Wachsthum begünstigen oder abschwächend oder tödtend wirken, theils durch Uebertragung auf empfänglichere oder weniger empfängliche Thiere. Hieraus ergiebt sich, dass die verschiedenen Methoden zur Herstellung von Impfstoffen nicht so schroff von einander geschieden sind, wie es Flügge hervorgehoben hat, der die schädigenden, degenerirte Arten hervorrufenden Methoden streng von den Methoden trennt, welche physiologische Varietäten der pathogenen Arten hervorrufen.

Gewisse Reize, wie Luftsauerstoff, Temperatur und Chemikalien, z. B. Karbolsäure, wirken nach Flügge in den bis jetzt am besten bewährten Anwendungsweisen auf die pathogenen Bakterien degenerirend. Dieselben erleiden nicht nur einen Verlust ihrer infectiösen und toxischen Eigenschaften, sondern sie wachsen auch schlechter als die pathogenen Stammarten. Für Abschwächungsversuche sind diese degenerirend wirkenden Reize noch nicht nach der Richtung genügend systematisch untersucht worden, ob sie nicht bei anderen Anwendungsformen und Concentrationen die Virulenz ebenfalls, wenn auch langsamer herabsetzen, aber unter Erhaltung und selbst Steigerung der Wachsthumsfähigkeit.

Dies ist im höchsten Grade wahrscheinlich, seit wir wissen, dass man durch die sterilisirten Stoffwechselprodukte der infectiösen Arten in ihrer Gesammtheit sowohl, als auch durch isolirte Toxine Impschutz bewirken kann. Im Einklang hiermit steht die bereits vorher bei der Hühnercholera von Pasteur, bei Rotz von Löffler, bei der Wild- und Schweineseuche durch Kitt, Schütz und mich, bei Lepra durch Bordoni-Uffreduzzi ermittelte Beobachtung, dass diese Bakterien unter dem Einflusse ihrer eigenen Stoffwechselprodukte spontan eine Einbusse und schliesslich Verlust ihrer Virulenz erleiden. Diese wenig oder nicht mehr malignen Abkömmlinge sind bisweilen degenerirt und wachsen schlechter, bisweilen wachsen sie aber üppiger und sie verhalten sich mehr wie gewöhnliche Saprophyten und zwar wie lebenskräftige, nicht maligne Modificationen oder Varietäten der pathogenen Arten. Dasselbe ist bei den Tuberkelbacillen der Fall, wenn man sie auf glycerinhaltigen Nähr-

böden kultivirt, wie ich einige Male sehr gegen meinen Wunsch erfahren musste. Verhindert man bei Milzbrandbacillen die Sporenbildung — ein Punkt, den Pasteur sofort richtig erkannt hatte — so kann man die Bacillen bei Temperaturen über 42° zur Degeneration bringen, züchtet man sie auf einem künstlichen Nährboden, auf dem sie die Sporen sehr langsam bilden, so können sie aber selbst bei ihrem Temperaturoptimum eine Einbusse an Virulenz erleiden, ohne zu degeneriren.

Demnach ist der Verlust an toxischen Eigenschaften durch Eingriffe zu erreichen, welche degenerirend, die Art schädigend wirken, und durch Eingriffe, bei denen ausschliesslich der Verlust der Virulenz in Frage kommt, bei dem aber die Art nicht geschwächt, sondern oft gestärkt und zum saprophytischen Leben geeigneter wird. Gruppen unter den infectiösen Bakterien können aber unmöglich auf derartige, durch Uebergänge verbundene physiologische Merkmale hin aufgestellt werden, weil derartige Uebergänge bei jeder einzelnen Art erreicht werden können, je nach dem Reize oder nach der Art, wie der Reiz einwirkt. Praktisch dagegen wird es wegen der Art und Leichtigkeit der Herstellung der Impfstoffe und wegen der Sicherheit des Impfschutzes vielleicht grosse Unterschiede machen, welchen Weg man wählt, ob Degeneration oder Varietäten bildende Eingriffe zu bevorzugen sind, und dies kann für einzelne Krankheiten oder Gruppen von Krankheiten vielleicht ganz verschieden sein.

Das naturwissenschaftliche Interesse an diesen Fragen wird stets ein sehr grosses sein, praktisch dagegen dürften diese Fragen mehr in den Hintergrund treten, seit wir direct mit sterilisirten Stoffwechselproducten und isolirten Toxinen die Schutzimpfungen anstreben.

Die meisten Fragen, welche bei Schutzimpfungen zu lösend sind, wurden bereits bei den Pockenimpfungen berücksichtigt und deshalb haben Wolffberg und L. Pfeiffer mit Recht wieder die Aufmerksamkeit auf die älteren, zum Theil sehr sorgfältigen und werthvollen Arbeiten gelenkt. Man hat bei den Pockenerkrankungen kennen gelernt, dass:

1. Das Ueberstehen der natürlichen Pocken gegen die Wiederkehr derselben schützt.

2. Dass das künstliche, cutane Impfen der ächten Pocken, „das“ Pocken oder die Variolisation gegen die natürliche Infection, welche durch einen anderen Infectionsmodus zu Stande zu kommen scheint, schützt. Man lernte dabei die Abhängigkeit vom Infectionsmodus derart kennen, dass die künstlich beigebrachten Pocken weniger bösartig waren, als die spontanen. Dieses im Oriente volksthümliche Verfahren wurde 1717 durch Lady Montagu im westlichen Europa bekannt.
3. Von Hirten war beobachtet worden, dass das Acquiriren der Kuhpocken gegen Menschenpocken schützte, und zuerst stellte Pless in einigen Versuchen, dann aber Jenner durch sorgfältige klassische Versuche nach jeder Richtung fest, dass „originäre“ Kuhpocken einen Schutz gegen Menschenpocken verleihen: Vaccination.
4. Thiele bewies 1839, dass die sogenannte „originäre“ Kuhpocke keine originäre Krankheit, sondern eine durch das Passiren des Thieres bewirkte mitigirte Menschenpocke ist, und Stamm und Bollinger zeigten dies später nochmals und bewiesen weiter, dass „originäre“ Kuhpocken nur vorkommen, wo vorher pockenkranke Menschen waren. Die gegentheilige Annahme eines anderen und abweichenden Ursprunges der „originären“ Kuhpocke dürfte wohl in dem Vorkommen bläschenartiger Eruptionen, besonders bakterieller Natur, wie die Wiltshire Cow disease, ihren wirklichen Grund haben.
5. Thiele zeigte, dass man ohne Verwendung des thierischen Organismus auch experimentell durch systematisches Austrocknen von Variolavirus und Verdünnen desselben mit Milch das Pockenvirus abschwächen kann.
6. Man beobachtete, dass bei der Vaccination das von der Kuh abstammende und dort geschwächte Variolavirus, die Vaccine, sich sehr schlecht von Kuh zu Kuh übertragen, dass wohl durch einmaliges Uebertragen im Organismus der Kuh ein bestimmter Grad der Virulenz sich erreichen, dass er sich aber auf diesem Wege schwer erhalten liess. Dieser Grad der Virulenz wurde dagegen, ohne sicher nach-

weisbare Steigerung, leicht erhalten, wenn man diese Vaccine von Menschen zu Menschen cutan weiter impfte. Diese humanisirte Lymphe, welche einen jetzt genau bekannten Grad des Impfschutzes verleiht, bemüht man sich jetzt wieder durch animalisirte Lymphe vom Kalbe zu verdrängen, weil man dabei das Mitübertragen etwaiger anderer Krankheiten sicherer ausschliessen kann, als wenn man von Menschen auf Menschen weiterimpft.

7. Bei allen diesen Versuchen lernte man, dass die Sicherheit des Impfschutzes von der Art der Impfung sehr abhängt, derart, dass das natürliche Ueberstehen der Pocken am besten und längsten, dann die Variolisation, darauf die Vaccination und bei letzterer wieder die humanisirte etwas besser, als die animalisirte Lymphe, schützten. Die Gefahr bei der Impfung selbst verhält sich gerade umgekehrt. Um diese fast verschwindende Möglichkeit einer Gefahr der Impfung mit dem mildesten Virus mit der Sicherheit des Impfschutzes zu vereinigen, wurde man gezwungen, die Impfung zu geeigneter Zeit, welche besonders vom Alter abhängt, zu wiederholen: Revaccination.

Die Impfung soll einen Schutz gegen eine gefährliche Krankheit verleihen und muss deshalb rechtzeitig vorgenommen werden, vor Ausbruch der Krankheit. Das ist der Sinn der Präventiven-, Präkautions- oder Schutz-Impfung. Bei schon ausgebrochener Epidemie können sich die noch nicht Ergriffenen durch eine Impfung zu schützen versuchen, welche dann als Noth-Impfung bezeichnet wird.

Diese allgemeine Fragen treten, seit Pasteur 1880 die Impffrage auf eine neue wissenschaftliche Basis gestellt hat, immer wieder auf und Pasteur fügte bei seinen Untersuchungen über Hundswuth eine neue Anwendungsweise der Impfung hinzu. Bei Infectionskrankheiten, deren Incubationsstadium ein sehr langes ist oder welche chronisch verlaufen, kann man versuchen, selbst nach erfolgter Infection durch Impfungen den Ausbruch der Krankheiten zu verhüten oder die Krankheit milder zu gestalten oder zu heilen. Dies sind dann therapeutische oder Heilimpfungen.

Das wesentlich Neue zur Erkennung des Wesens des Imfpschutzes war aber, dass Pasteur direct zeigte, dass die Parasiten der Infectionskrankheiten ihre Virulenz einbüssen und verlieren, dass er zuerst künstlich die Virulenz durch verschiedenartige Eingriffe zu beeinflussen lehrte, dass die künstlich und absichtlich veränderten Abkömmlinge sich als Impfmaterial, „Lymphe“, „Vaccin“, gegen die virulente Stammart verwerthen liessen.

Bei diesem experimentell beherrschbaren Ausgangspunkte blieb man nicht stehen. Toussaint, später Chauveau, vor Allen Smith und Salmon, dann Roux und Chamberland zeigten, dass die sterilen Stoffwechselprodukte einen Impfschutz verleihen, und Beumer, Foà und Bonome fanden, dass die Toxine auch gegen die Intoxication schützen, und dies stellt die neue Aufgabe, den Impfschutz, wenn möglich, mit reinen Stoffwechselprodukten, mit Toxinen anzustreben, weil man hierbei ganz genau die Menge bestimmen kann. Roux zeigte, dass die Schutzimpfung gegen malignes Oedem nicht gegen Rauschbrand, dagegen umgekehrt die Rauschbrandschutzimpfung auch gegen malignes Oedem schützt. Wie weit bei diesen sehr ähnlichen Krankheiten die Bildung verschiedener Mengen bestimmter Stoffwechselprodukte in Frage kommen kann, ist noch unsicher. Doch geht daraus hervor, dass man auch allgemeinere Methoden des Impfschutzes gegen verwandte Krankheiten, gegen Krankheitsgruppen in Betracht ziehen darf, und da vielleicht das Wesentlichste in bestimmten Toxinen liegt, dass man auch hierbei an Impfungen mit reinen chemischen Körpern denken darf.

Dass die Impfschutz und reactive Entzündung erregenden Körper, welche bis jetzt isolirt wurden, Eiweisskörper sind, und dass dieselben von den eigentlichen specifischen Giften, den Toxalbuminen im engeren Sinne, verschieden sind, wurde bereits früher S. 392 erwähnt. Durch die Isolirung dieser Schutz- und Heilstoffe wird deren Dosirung erleichtert und damit die Gefahr der ursprünglichen Pasteur'schen Methode, d. h. die Mitübertragung von mehr oder weniger abgeschwächten Infectionserregern vermieden.

Die Impfung durch Stoffwechselprodukte lässt die Frage aufwerfen, ob die Toxine den Chemismus des Blutes und der Gewebe alteriren oder, da der Chemismus auf die Dauer doch stets von dem

Zustande der stabilen Formelemente abhängt, ob nicht vielmehr die Zellen und Zellterritorien beeinflusst werden. Wenn die Zellen als die stabilen Elemente beeinflusst werden, so kann dies dadurch geschehen, dass die amoeboiden Zellen des Körpers die Fähigkeit, fremde, lebende Elemente, wie es die Parasiten sind, in sich aufzunehmen, dieselben zu „fressen", in verstärktem Maasse gewinnen. Das ist der wesentliche Inhalt der Phagocytenlehre von Metschnikoff.

Dass todte Bakterien und gewisse Stoffwechselprodukte und Proteïne derselben chemotaktisch wirken, also die Leukocyten mobilisiren, wurde bereits angegeben. Es könnte aber auch sein, dass der Stoffwechsel der Gewebe durch den auf die Zellen ausgeübten specifischen Reiz dauernde specifische Aenderungen erleidet, so dass er bei dem Austausche der gelösten Bestandtheile zwischen Blut und Gewebszellen das Wachsthum der Parasiten chemisch hindert, dass die Körpersäfte sowohl antiparasitäre als auch „antitoxische" oder „antifermentative" Eigenschaften gewinnen oder vorhandene derartige Eigenschaften eine Zunahme erfahren. Dann würden die amoeboiden Zellen nur die Aufgabe haben, die bei der natürlichen Entwicklung und Involution abgestorbenen und die im Gewebe oder Blute durch den Chemismus der Säfte getödteten Bakterien wie fremde, leblose Bestandtheile, z. B. wie Zinnoberkörner aufzunehmen und fortzuschaffen. Diese Auffassung vertreten besonders Baumgarten, Flügge und Weigert. Nach F. Fischel kann der Zerfall von Leukocyten umgekehrt vorhandene Giftwirkungen der Säfte herabsetzen. Auf jeden Fall müssen die Beziehungen zwischen Zellen und Parasiten in sorgfältigster Weise berücksichtigt und sowohl histologisch als experimentell geprüft werden.

Ueber diesen neuerdings mit grossem Eifer studirten internen Schutzmitteln des Körpers gegen Parasiten und deren Gifte, also den Eiweisskörpern der Säfte, den festen und beweglichen Zellen, darf man natürlich die anderen Schutzwehren, wie Flimmerepithelien, Säure des Magens, nicht vergessen. Im Dünndarm möchte ich noch auf eine bis jetzt wenig beachtete chemische Schutzeinrichtung hinweisen. Nach Hofmeister werden die durch die Verdauungssäfte gebildeten gelösten Eiweisskörper durch die Thätigkeit der Darmepithelien

in gerinnbare Eiweisskörper zurückverwandelt. Die normalen Peptone sind im Blute nach Schmidt-Mülheim Gifte. Hiernach üben die Darmepithelien eine wichtige antitoxische Function aus. Bei jeder Darmkrankheit, bei welcher die Epithelien abgestossen sind, wie bei der Cholera, liegen demnach die resorbirenden Lymphgefässe ungeschützt da und müssen die nach Scholl's Ermittelungen der Klasse der Peptone angehörigen Gifte unvermittelt der Blutbahn zuführen. Die ächten Peptone wirken nicht chemotaktisch, wohl aber die sich anschliessenden höheren Eiweisskörper. Bei jeder Verdauung finden wir aber in der Darmwand auch eine vermehrte Leukocytose, welche jetzt ihre ungezwungene Erklärung in der Ueberführung der Peptone durch die Darmepithelien in trophotaktische Eiweisskörper findet. Durch diese Erklärung wird endlich auch die Abnahme und das Ausbleiben der Leukocytose bei Verdauungsstörungen erklärt.

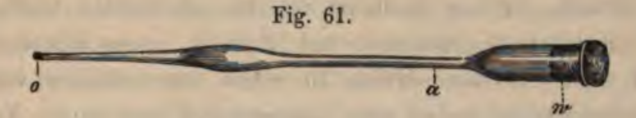
Die Leukocyten vermögen eine Reihe verschiedener Functionen auszuüben, welche zum Theil erst in letzter Zeit durch die bakteriologische Forschung erkannt wurden: 1. sie halten die Saftbahnen frei, indem sie anorganische oder organische, todte korpusculäre Elemente, also auch abgestorbene Mikrobien (Baumgarten, Weigert, Flügge) aufnehmen und weiter transportiren (Fressen, Voracität nach Virchow); 2. sie wirken antiparasitär, indem sie a) im Zustande der vita minima befindliche, aber an sich lebens- und entwicklungsfähige Keime, Sporen, aufnehmen und zu Organen, Geweben, Zellterritorien transportiren, in denen sie durch Gewebszellen und Säfte vernichtet werden, b) indem sie als Phagocyten (Metschnikoff) lebende und virulente Mikrobien in sich aufnehmen, dieselben in ihrer Vitalität und Virulenz schwächen und dieselben tödten, oder c) indem sie eindringende Mikrobien wallartig (Ribbert) umgeben und dadurch gegen das gesunde Gewebe abschliessen; 3. sie wirken antitoxisch (antifermentativ), a) indem sie durch den Reiz von giftigen (ev. enzymartigen) Stoffwechselproducten oder Proteïnen der Mikrobien angelockt werden (Chemotaxis) und sich deshalb an den bedrohten Ort begeben (H. Buchner, Gabritschewsky, Hueppe und Scholl); werden diese Reize stärker, so bewirken sie b) Necrobiose (Coagulationsnecrose) oder Necrose der

Gewebszellen (Buchner, Hueppe) und lähmen c) die Motilität der Wanderzellen, welche dadurch an der Rückwanderung verhindert werden (Buchner, Hueppe), so dass die reactive Entzündung (a) in Eiterung übergeht. Nicht die Emigration (Waller, Cohnheim), sondern die Verhinderung der Rückwanderung ist das Characteristikum der Eiterung. Die Eiterung, welche dem Körper brauchbare Substanzen entzieht und sonst vortheilhafte Wanderzellen ausser Kampf setzt, hat sich phylogenetisch und ontogenetisch aus der nützlichen phagocytären, antitoxischen, chematactischen und trophotactischen Reizwirkung entwickelt, durch welche alle Zellen, Zellterritorien, Gewebe und Organe zur Nahrungsaufnahme veranlasst und zur Abwehr schädlicher Momente befähigt werden. 4. Jedes necrotische Gewebe, mag es nun secundär durch allmählige Steigerung eines Reizes (Virchow, Buchner, Hueppe), oder primär (Cohnheim, Weigert) durch von Anfang an zu starke chemische oder mechanische Mittel hervorgerufen sein, ist für den Körper zu einem Fremdkörper geworden, ist an Ort und Stelle hinderlich und werthlos und muss entfernt werden; ein Theil der necrotischen Stoffe ist aber noch für den Gesammtstoffwechsel brauchbar und wird zum Theil gelöst und resorbirt, ein anderer Theil wirkt als Nährstoff anlockend auf Wanderzellen (Trophotaxis), so dass die letzteren sich hierdurch an der Beseitigung, Transportirung und Vernichtung des necrotischen Materials nützlich betheiligen; 5. in analoger Weise wirken andere Nährstoffe (Buchner) anlockend auf Leukocyten (Trophotaxis), so dass sich dieselben an der Resorption (Hofmeister) der normalen Nahrung betheiligen und dieselben zu den blutbereitenden Organen befördern helfen; die Verdauungsleukocythose ist demnach eine Trophotaxis (Hueppe); 6. die Leukocyten betheiligen sich an der Regeneration der specifischen Formelemente des Blutes; 7. dieselben stellen (Metschnikoff, J. Meier) ein wanderndes adenoides Gewebe dar und können dadurch als Material zur Verstärkung und Vergrösserung bereits localisirten adenoiden Gewebes, wie der Lymphfollikel, Drüsen, und selbst zur Neubildung solcher Organe an Orten führen, wo sie normal fehlen; sie erhöhen auf diese Weise die gegen die Infection (2) und Intoxication (3) vorhandenen Wehrmittel an besonders bedrohten Orten. Die Wanderzellen sind ge-

wissermaassen bewegliche Truppen der Festung unseres Organismus, welche sich an die bedrohten Punkte begeben und festlagern, wo der normal sonst genügend feste Wall der Epithelien mechanisch und chemisch ungenügend ist; 8. die normalen antiparasitären und antitoxischen Wirkungen des Blutserums, der Lymphe, der Gewebssäfte werden durch Zerfall der Zellen dieser Säfte herabgesetzt, so dass sie gerade umgekehrt durch Zerstörung rother Blutkörperchen (Buchner) und lymphoiden Zellen (F. Fischel) sogar zu einem guten Nährboden für Mikrobien werden; durch ihr Absterben können die Wanderzellen noch für den Verlauf einer Infection Bedeutung haben.

Abschwächungen können durch den Sauerstoff der Luft erfolgen. Dies hatte Pasteur zuerst für Hühnercholera angegeben. In den Kulturen spielen aber neben der Luft noch Stoffwechselprodukte und Temperatur eine grosse Rolle, so dass man eine Controlle nöthig hat, welche man nach Roux in folgender Weise aus-

Fig. 61.



führen kann. Ein kapillares Röhrchen, Fig. 61, wird durch Saugen bis a mit der früher geprüften Kulturflüssigkeit gefüllt, dann wird bei o und darauf bei a zugeschmolzen. Ebenso wird ein grösseres Röhrchen, Fig. 51, S. 369, mit einer geringen Menge derselben Flüssigkeit F gefüllt und über dem Wattepfropf w bei h zugeschmolzen, so dass eine beträchtliche Menge Luft zugegen ist. War im ersten Röhrchen etwas Luft vorhanden, so wird dieselbe durch die sich entwickelnden Bakterien schnell verbraucht, so dass das weitere Wachsthum sich ohne Luft vollzieht. Man kann also den Einfluss der Luft bei gleicher Temperatur studiren und dadurch den Einfluss der letzteren ausschalten. Den Einfluss der Stoffwechselprodukte muss man aber noch besonders beachten, da bei Luftzutritt Oxydation und Spaltungen, bei Luftabschluss nur Spaltungen erfolgen. Der Abschluss der Luft ist, wie aus Duclaux's Versuchen mit den alten Kulturen Pasteur's hervorgeht, bei mässigen Temperaturen ein vorzügliches Mittel zur Erhaltung der Lebensfähigkeit der Keime.

Die Abschwächung durch Trocknen ist von Pasteur bei der Hundswuth angewendet worden, indem er Stückchen von der medulla oblongata oder vom Rückenmark, dem Hauptsitze des Virus, unter aseptischen Kautelen entnahm und Tage lang in Gläschen aufhing, deren Luft durch am Boden deponirte Stücke Kaliumhydrat trocken erhalten wurde.

Die Conservirung der Virulenz des Rückenmarks, sowohl der ursprünglichen, als der im Kaninchen gesteigerten, als der durch Trocknen erreichten bestimmten schwächeren Grade, kann man nach Roux erstreben, wenn man die Stückchen Rückenmark in 30 % Glycerin einlegt.

Abschwächungen durch Temperatur erfolgen in genauen Thermostaten, als Beispiel eignet sich besonders der Milzbrand, cf. S. 397, und Rauschbrand, bei dem man im Gegensatze zum Milzbrand gerade die Sporen abzuschwächen versucht. Der Inhalt von Rauschbrandgeschwülsten und frisches, typisch schwarzrothes, rauschbrandiges Fleisch, welches in dünne Scheiben geschnitten wird, werden zuerst an der Luft getrocknet und dann in einem Mörser fein gestossen oder auf einer Mühle zu einem feinen Pulver vermahlen. Zum Abschwächen bedarf man Temperaturen über 80°. Nach Arloing, Cornevin und Thomas verreibt man das trockene Pulver, welches das unabgeschwächte Virus enthält, mit der doppelten Menge Wasser und setzt die Mischung 6—7 Stunden bei 100° aus, man erhält dadurch den ersten schwächeren Impfstoff; setzt man dieselbe Mischung ebenso lange bei 85° aus, so erhält man den zweiten stärkeren Impfstoff. Beide werden wieder getrocknet und ev. vorräthig gehalten. Kitt erzielte einen bestimmten Grad der Abschwächung, wenn er das trockene Pulver 6 Stunden im strömenden Dampfe bei 100° erhitzte und es dann wieder über Chlorcalcium trocknete. Zum Gebrauche wird das Pulver mit sterilisirtem Wasser übergossen, verrieben und unfiltrirt oder durch ein sterilisirtes, feines Drahtsieb filtrirt zur Injection verwendet.

Für Milzbrand giebt es keine so scharfe Methode. Bei der Einwirkung der Temperatur von 42 bis 43° spielen Theile eines Grades schon stark mit; je näher an 42 desto langsamer, je näher an 43 desto schneller ist die Abnahme eingetreten. Das beste Kri-

terium bieten deshalb nach Koch, Gaffky und Löffler die Thiere. Als I. schwächsten Impfstoff betrachtet man einen solchen, welcher nur noch Mäuse tödtet, als II. stärkeren einen, der Meerschweinchen noch sicher, Kaninchen aber schon unsicher tödtet; das Kriterium für den II. ist leider nicht so scharf, wie für den I. Cienkowski hat sich der Murmelthiere statt der Kaninchen vortheilhaft bedient.

Von physikalischen Agentien ist von Bert und Chauveau auch der Druck angewendet worden und bei 38 bis 39° liess sich durch einen Druck von 8 Atmosphären ein bestimmter Grad der Virulenz fixiren.

Als Beispiel des Einflusses chemischer Agentien auf die Virulenz und die Möglichkeit der Gewinnung von Impfstoffen kann die Karbolsäure nach Chamberland und Roux S. 401 dienen.

Smirnow und Flügge haben gezeigt, dass die durch degenerirende Eingriffe erzielten Impfstoffe chemischen Eingriffen gegenüber weniger widerstandsfähig sind als die virulenten Kulturen. So wuchs z. B. bei Zusatz von 4 Tropfen 2 % Salzsäure zur Nährgelatine der virulente Milzbrand gut, der 16 Tage abgeschwächte zeigte Verzögerung des Wachsthums und der 35 Tage abgeschwächte wuchs nicht mehr.

Als Beispiel des Einflusses des Nährbodens und der daraus abgespaltenen Stoffwechselprodukte auf Abnahme der Virulenz möchte ich die Kultur der Tuberkelbacillen auf Glycerin-Agar, die Kultur der Wildseuche auf demselben Boden und der Rotzbacillen auf Kartoffeln bezeichnen. In diesen Fällen ist der gleichzeitige Einfluss der Luftsauerstoff nicht sicher ausgeschlossen, aber durch Kulturen auf anderen Medien als nebensächlich beweisbar.

Das Passiren des Thierkörpers setzt bisweilen die Virulenz herab. Die Bakterien des Schweinerothlaufs werden im Kaninchenkörper in wenig Uebertragungen, fast sprungweise, abgeschwächt, ebenso wird das Virus der Hundswuth im Organismus der Affen weniger virulent. Umgekehrt wird das Virus des Schweinerothlaufs in Tauben, das der Hundswuth in Kaninchen giftiger und zwar das letztere derart, das die Incubationszeit, welche anfangs ca. 15 Tage beträgt nach mindestens 20 maligem Passiren von Kaninchen zu

Kaninchen auf 6 bis 8 Tage herabgeht. Diese giftigen Formen sind wissenschaftlich sehr interessant, weil sie uns über die Steigungsmöglichkeiten der Virulenz und die phylogenetische Gewinnung der Virulenz von saprophytischen Arten Aufschluss geben, und dann weil sie zu prüfen gestatten, ob eine Schutzimpfung den äussersten Grad der Sicherheit hat.

In letzter Hinsicht ist zu beachten, dass praktisch keine Schutzimpfung mehr zu leisten hat, als gegen die höchsten natürlichen Grade der Virulenz und gegen den natürlicheu Infectionsmodus der Epidemieen zu schützen. So schützen z. B. Grade des Impfschutzes, welche nach Pasteur gegen Milzbrand als Wundinfectionskrankheit sicher sind, nach Koch, Gaffky und Löffler nicht sicher gegen Darmmilzbrand durch Sporenfütterung. Der Schutz gegen die „Strassenwuth“, die Wuth durch Hautimpfung oder Biss, d. h. gegen die spontane Krankheit schützt nicht sicher gegen die ganz künstliche und virulentere Einbringung des Virus direkt ins Gehirn.

Zur Einübung der Technik und zur Orientirung über die experimentelle Seite der Fragen eignen sich nur solche Krankheiten, welche an den kleinen Thieren vorgenommen werden können, die im Laboratorium leicht zu beschaffen sind. Als solche Beispiele betrachte ich Mäuseseptikaemie, Schweinerothlauf, Hühnercholera, Milzbrand, Rauschbrand und allenfalls noch Hundswuth und malignes Oedem.

Die Mäuseseptikaemie von Koch ist vielleicht nur eine durch die fortwährenden Versuche an kleinen Versuchsthieren entstandene Modifikation des sog. Schweinerothlaufs. Impft man Kaninchen cutan oder allenfalls subcutan am Ohr, so kann man nach Löffler innerhalb einiger Zeit bis zu etwa 3 bis 4 Wochen sehen, dass Impfungen am anderen Ohre oder anderen Körperstellen noch Erfolg haben. Von diesem Zeitpunkte ab schlagen aber neue Impfungen nicht mehr an und das Thier ist gegen die Krankheit immunisirt. Dies ist also, wenn man die Mäuseseptikaemie als spezifische Krankheit gelten lässt, ein Beispiel über Impfschutz durch das Ueberstehen derselben unabgeschwächten Krankheit.

Die Darstellung der Impfstoffe von Hühnercholera erfolgt am besten in dünnen Bouillonschichten in Erlenmeyer'schen Kölbchen

bei ca. 42°. Man impft Hühner oder Tauben mit dem I. Impfstoffe subcutan an beiden Flügelspitzen, mit dem II. wird nach 12 bis 15 Tagen ebenso verfahren. Die Prüfung mit dem virulenten Material erfolgt einige Wochen später durch intramuskuläre Application am Brustmuskel.

Die Impfstoffe für Milzbrand werden zwischen 42 und 43° in Bouillon in Erlenmeyer'schen Kölbchen dargestellt und von Zeit zu Zeit durch Uebertragungen auf Kaninchen, Meerschweinchen und Mäuse geprüft. Feltz, später Roux und Chamberland haben gezeigt, dass man auch Kaninchen gegen Milzbrand immunisiren kann.

Man injicirt unter Druck 40 ccm des I. Vaccin in die Ohrenvene; am folgenden oder zweitfolgenden Tage wiederholt man dies Verfahren und nach einer Woche können die Thiere 0,25 ccm des II. Vaccins ohne Gefahr subcutan vertragen, während sie sonst diesem Grade noch oft erliegen. Die so behandelten Thiere sind nun gegen den vilurenten Milzbrand immun.

Rauschbrandvirus wird nach Kitt durch Erwärmen des getrockneten Gewebssaftes im Dampfstrome bei 100° hergestellt und dann wieder getroknet; cf. S. 442. 3 ctgr dieses Pulvers mit Wasser verrieben und subcutan injicirt bewirkten bei Meerschweinchen eine locale entzündliche, nicht vereiternde Anschwellung. Diese nur einmal vorgeimpften Thiere erlagen der subcutanen Anwendung auch grosser Gaben des virulenten Materials nicht.

Für Hundswuth verschaffe man sich erst durch intrakranielle Impfungen von Thier zu Thier das virulenteste Material bei Kaninchen. Das Rückenmark oder die Medulla oblongata derselben wird in Stückchen getrocknet. Ein kleines Stückchen dieses Materials wird mit etwas sterilisirter Hühnerbouillon verrieben und nach Sedimentirung der groben Partikel subcutan injicirt. Man beginnt bei Hunden mit 15 Tage altem Mark und schreitet zur präventiven Schutzimpfung mit möglichst wenig Ueberspringen zwischenliegender Stadien bis zu eintägigem Mark fort. Diese Hunde sind nicht nur gegen „Strassenwuth" durch Biss und gegen die subcutane, sondern zum Theil auch gegen die intracranielle Application des virulentesten Materials geschützt. Die Heilimpfungen müssen je nach der Zeit, welche nach

dem Bisse verflossen ist, sehr abgekürzt werden und sie werden um so unsicherer je schneller hinter einander sie vorgenommen werden müssen.

Bei malignem Oedem stellt man anaërobe Kulturen in alkalischer Bouillon her, welche nach 6 Tagen im Brütofen fertig sind. Diese Kulturen befreit man durch Filtriren oder durch kurzes Erhitzen im gespannten Dampfe von ihren lebensfähigen Keimen und Sporen. Von dieser sterilen, nur die Stoffwechselprodukte und Toxine enthaltenden Flüssigkeit, kann man intraabdominal auf einmal 30 bis 40 ccm injiciren; Roux und Chamberland injiciren gewöhnlich 120 ccm in drei Portionen. Wurden die Thiere zwei Tage nach der letzten Injection mit virulentem Material subcutan injicirt, so blieben sie gesund.

Die Dosirung der Impfschutz verleihenden Eiweisskörper sind noch nicht allgemein anzugeben.

Zum Studium der Beziehungen der Parasiten zu den Zellen kann man sich folgender Versuchsanordnungen bedienen. Hess stellt kleine Glaskammern dadurch her, dass er 15 qmm grosse Deckgläser auf ebenso grosse Objectträger kittete, so dass der kapillare Spaltraum zwischen beiden Gläsern auf drei Seiten geschlossen ist. Von der vierten, offenen Seite her wird mittelst Platinöse das zu prüfende Material in den Spaltraum gebracht und die so vorbereitete Glaskammer wird unter antiseptischen Vorsichtsmaassregeln unter die Rückenhaut der Thiere eingebracht. Nachdem die Kammern verschieden lange Zeit dort gelegen haben, werden sie herausgenommen und direkt durchmustert, dann löst man das Deckglas vom Objectträger und stellt von beiden Trockenpräparate her.

Metschnikoff hat nach Kroutizine die feine, den Markraum des Schilf (Phragmites communis) ankleidende Membram frei präparirt. Dies gelingt einfach, wenn man an einer Stelle eines ca. 4 bis 5 cm langen Stückes die Membran frei legt und zubindet und dann einen abgerundeten Glasstab an dieser Stelle, an der die Membran sackartig geschlossen, der Markraum aber offen ist, in den Markraum einführt und durch den ganzen Raum durchdrückt. Man kann dann die ganze Membran unverletzt als Sack auf der anderen Seite heraustreten lassen. Dann bindet man ein entsprechend langes

Stück auch an der andern Seite zu und hat nun eine geschlossene Hülle, welche sich zu Diffusionsversuchen gut eignet. Dieselbe wird durch Dampf sterilisirt unter Oeffnen eines der schliessenden Seidenfäden geimpft, wieder zugebunden und unter die Rückenhaut des Thieres gebracht. Ist die Gewebsflüssigkeit tödtend oder schwächend, so muss sie, in diesen Sack diffundirend, auch dort die Parasiten tödten. Sind die Zellen das vernichtende Agens, so muss der Einfluss ausbleiben, weil dieselben nicht durch die Membran hindurch ins Innere zu den Parasiten gelangen. Baumgarten und Petruschky haben Dünndarmsegmente des Frosches, welche auf Strecken von 1 bis 2 ccm abgebunden waren, getrocknet und als Diffusionskammern benutzt. Metschnikoff hat schliesslich den Einschluss in einfachen Kapseln von zusammengelegtem Filtrirpapier vorgenommen.

---

17. Der Gang der Kultur und die biologische Bedeutung der Kulturen.

Litteratur.

Hueppe: Ueber Beziehungen der Fäulniss zu den Infectionskrankheiten 1887; und der Abschnitt »Wasser als Krankheitsursache« in meiner Arbeit über »Die hygienische Beurtheilung des Trinkwassers vom biologischen Standpunkte« im Journal für Gasbeleuchtung und Wasserversorgung 1887, No. 11 ff; ferner Berliner klinische Wochenschrift 1886, No. 44 und 1887 No. 9.

Der Gang der Kultur zur Erzielung von Reinkulturen bestimmter Arten ergiebt sich aus dem spontanen Vorkommen der Bakterien. Bei den saprophytischen Arten, den Pigment- und Fermentbakterien, wird man in der Regel mit Plattenkulturen von Gelatine oder Agar-Agar das Ziel erreichen, wenn man die Lösungen dem bestimmten Falle anpasst. Man wird für alle Kulturmethoden die oft grossen Vortheile, welche eine vorbereitende Massenkultur durch Gährung oder Thierversuch gewährt,

meist vortheilhaft anwenden, besonders unter Berücksichtigung der Erhitzung und der Anaërobiose.

Von den parasitischen Bakterien werden mit grösster Wahrscheinlichkeit diejenigen, bei denen die Epidemiologie einen Fingerzeig giebt, dass sie wahrscheinlich facultative Parasiten oder facultative Saprophyten sind und sich ganz oder unter bestimmten Verhältnissen ausserhalb des thierischen Organismus erhalten können, in Gelatine- oder Agar-Agar-Plattenkulturen rein gewonnen werden können. Die neutrale Pepton-Kochsalz-Bouillon ist für diese Fälle das universellste Nährmaterial.

Bei den obligat parasitischen Bakterien, wie es in mehr oder weniger hohem Grade die Parasiten der rein contagiösen Krankheiten sind, stehen zur Zeit nur die Blutserumkulturen von Koch oder meine Blutserumplatten zu Gebote unter Berücksichtigung der Momente zur Gewinnung eines reinen Ausgangsmaterials. Für diese Organismen dürfte in Zukunft neben dem erstarrten Blutserum das durch Filtration sterilisirte flüssige oder das steril aufgefangene Blut von grösster Bedeutung werden.

Für diejenigen Bakterien, welche sich bis jetzt auf festem Nährboden nicht oder nur schlecht gewinnen liessen, sei es nun, dass die Festigkeit als solche störend war oder dass die Gelatine oder das Agar-Agar chemisch oder durch ihre Concentration das hindernde Moment waren, und für manche obligate Parasiten und vielleicht auch für die amoeboiden parasitischen Mikroorganismen, welche einigen Krankheiten zu Grunde liegen, wird man wohl die bis zur Ein-Zell-Kultur getriebene Verdünnungsmethode anwenden müssen.

Für andere Mikroorganismen, wie Schimmelpilze, Hefen, lässt sich der feste Nährboden, sowohl in undurchsichtiger Form der Kartoffelscheiben, des Kartoffelbreies und eines dicken Brodbreies verwerthen, als auch in der durchsichtigen Form der Gelatine- und Agar-Agar-Kulturen. Man hat nur auf die Reaction zu achten und dieselbe in der Regel im Gegensatze zu den Bakterienkulturen schwach sauer zu halten und für die Nährsubstrate das spontane Vorkommen in Betracht zu ziehen. Die universellste Lösung für diese Organismen ist die Bierwürze.

Während man früher in den Reinkulturen nur ein Mittel zum Zwecke einwandsfreier positiver Uebertragungen sah, hatte Koch auf Grund der in den Reinkulturen sich manifestirenden biologischen Eigenschaften erklärt, dass nicht der geringste Grund vorliege, die Aetiologie des Milzbrandes durch eine fortlaufende Anpassung ganz harmloser Schmarotzer an die parasitische Lebensweise zu erklären, sondern dass die Milzbrandbacillen für die Erhaltung der Art gar nicht auf den thierischen Körper angewiesen sind, dass sie ausserhalb des Organismus, wenigstens zeitweilig, alle Lebensbedingungen finden und dass ihr Parasitismus nur ein gelegentlicher ist.[1]) Dann gelang es Koch zum ersten Male, die Parasiten einer contagiösen Krankheit, der Tuberkulose, künstlich ausserhalb des thierischen Körpers zu züchten[2]) und Brefeld[3]) entwickelte auf Grund seiner Ermittelungen über das saprophytische Stadium der parasitischen Brandpilze der Cerealien die Ansicht, dass es auch bei den „Parasiten im engsten Sinne“ bei Anwendung der richtigen Methoden gelingen dürfte, sie von dem parasitischen Leben wieder abzubringen. Im Anschlusse hieran führe ich aus,[4]) dass jede Reinkultur nichts anderes ist als das saprophytische Stadium parasitischer Mikroorganismen, und ähnlich fasste de Bary[5]) die Fähigkeit des „Gezüchtwerdens“ parasitischer Bakterien in todter organischer Substanz auf.

Die bisherigen Erfahrungen haben sicher gestellt, dass Bakterien oder deren Keime ausserhalb des Thierkörpers in der Erde, dem Wasser und in der Luft vorhanden sind. Aus der Luft können sie auf den Erdboden oder ins Wasser gelangen und umgekehrt müssen auch die im Wasser oder der Erde vorhandenen Bakterien in die Luft gelangen können. Nur in der Erde und im Wasser finden die Bakterien sämmtliche Existenzbedingungen, während sie

[1]) Zur Aetiologie des Milzbrandes. Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte Bd. I, 1881, S. 49.

[2]) Berliner klin. Wochenschrift 1882, No. 15.

[3]) Die künstliche Kultur parasitischer Pilze. Botanische Untersuchungen über Hefenpilze V, 1883, S. 1.

[4]) Fortschritte der Medicin 1884, No. 2, S. 70.

[5]) Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze 1884, S. 526.

in der Luft immer nur Verunreinigungen, wenn auch kaum vermeidbare, darstellen. Zum Zustandekommen einer Bakterienvegetation gehören Nährsubstanzen, Luft oder ev. Luftabschluss. Feuchtigkeit und bestimmte Temperatur. Die Nährsubstanzen müssen in einer bestimmten Concentration vorhanden sein, so dass bald ein stärkerer Zutritt von Feuchtigkeit, bald eine Verringerung des Feuchtigkeitsgrades die günstigen Bedingungen schaffen kann; tritt dann noch eine zusagende Temperatur ein, so wird die Bakterienvegetation ein Maximum erreichen können. Je nach dem Zusammentreffen dieser Umstände ist bald die eine, bald die andere Art im Kampfe ums Dasein bevorzugt, und da sich derartige Verhältnisse oft auf kleineren Räumen concentriren, ist weiter die Möglichkeit gegeben, dass sich kleinere oder grössere Anhäufungen, Localisationen, bestimmter Arten ausbilden. Strömendes Wasser tritt solchen Lokalisationen entgegen, dagegen wird man in mehr stillen und stagnirenden Wassern derartige Prozesse wohl nie vermissen, vor allem aber die Bildung solcher Heerde im Boden erwarten dürfen. Während die Luft und strömendes Wasser wesentlich nur als Träger und Verbreiter von Bakterien und deren Keimen sich darstellen, sind stille oder gar stagnirende Wasser und der Erdboden die eigentlichen Brutstätten der saprophytischen Bakterien. Da aber die beste Concentration der Nährsubstanzen, der richtige Feuchtigkeitsgehalt und die günstigste Temperatur sich nicht immer zusammen finden oder sich in ungünstiger Weise ändern können, tritt zur Erhaltung der Art die Fructification oder Sporenbildung ein, welche es der Art ermöglicht, bei ungünstigen äusseren Verhältnissen zu persistiren. Die natürlichen Brutstätten der Bakterien in der Erde und event. im Wasser können deshalb bald vegetative Formen, bald Ruheformen, bald Fructifications- und Dauerformen führen, und in einer dieser Formen gelangen dann die Keime der Saprophyten und facultativen Parasiten in die allgemeinen Verbreiter, die Luft und das fliessende Wasser. Aber auch Dauerformen von solchen Bakterien, welche nirgends in diesen natürlichen Heerden ausserhalb des thierischen Organismus zu keimen vermögen, können z. B. mit dem Sputum oder mit Dejectionen in Wasser, Boden oder Luft gelangen und auf einem

der geschilderten Wege schliesslich irgendwo deponirt werden, so dass sie auch indirect einen Gesunden befallen können.

Um diese allgemeinen biologischen Verhältnisse epidemiologisch besser und unbefangener verwerthen zu können, als es gewöhnlich geschieht, ist es nöthig über den Parasitismus der Bakterien eine möglichst wenig doctrinaire, von Einseitigkeiten und Extremen freie Ansicht zu gewinnen. Eine derartige Beurtheilung ist schon angebahnt durch die Untersuchungen und Ansichten von Brefeld, Koch, von Pettenkofer, van Tieghem, de Bary und mir. Es giebt Bakterien, welche schon bei Temperaturen unter 15° C. vegetiren und Dauerformen bilden, wieder andere vegetiren bei derselben Temperatur, vermögen aber nur über 15° Dauerformen zu bilden, so dass sie nur zu bestimmten Zeiten und an bestimmten Orten die Gelegenheit zur Vollendung ihres ganzen Formenkreises unter den natürlichen Verhältnissen finden. Diese Bakterien sind, weil sie zur Erhaltung der Art nur auf todte Substrate angewiesen sind, Saprophyten. Manche dieser Saprophyten, z. B. die Milzbrandbacillen, Typhusbacillen, vermögen aber, in den thierischen Körper gelangt, diesen krank zu machen; ihr Parasitismus ist aber nicht absolut nöthig zur Arterhaltung, er ist nur ein gelegentlicher, ein facultativer, sie sind facultative Parasiten.

Einen höheren Grad der parasitischen Adaption repräsentiren Arten, welche in der Regel den ganzen Kreislauf, vegetative Zustände und Fructification im thierischen Organismus durchmachen, welche sich aber gelegentlich auch ausserhalb des lebenden Organismus bei richtiger Nahrung, Feuchtigkeit und Temperatur, eine Zeit lang lebensfähig und virulent erhalten uud vermehren. Diese saprophytische Lebensweise ist nur eine gelegentliche, eine facultative, aber sie genügt nicht sicher zur Arterhaltung; diese Arten sind facultative Saprophyten. Für die eine oder andere dieser Arten, welche bei uns nur gelegentlich saprophytisch zu existiren vermag, bieten heissere Klimate, die Tropen, vielleicht die Möglichkeit eine rein saprophytischen Existenz, sodass sie bei unseren klimatischen Verhältnissen in der Regel nur als facultative Saprophyten existiren,

während sie in ihrer Heimath wohl stets als facultative Parasiten fortkommen; dies gilt z. B. wohl von den Choleraspirochaeten.

Eine andere Gruppe von Bakterien findet unter natürlichen Verhältnissen nur im thierischen Körper noch Gelegenheit zur Existenz in vegetativer Form und zur Bildung von Dauerformen und selbst in den Tropen dürften ihre vegetativen Formen ausserhalb des Organismus wohl nirgends fortkommen. Diese obligaten Parasiten zeigen aber verschiedene Grade der Anpassung an die parasitische Lebensweise, insofern es einige Mal im Experimente gelungen ist, in Reinkulturen künstlich eine Art tropisches Klima herzustellen, welches ihnen gestattet, auch ausserhalb des Organismus fortzukommen, während dies unter natürlichen Verhältnissen nicht mehr möglich ist, wie es z. B. die Bakterien der Tuberkulose lehren. Andere Bakterien dieser Gruppe, z. B. die Spirochaeten des Rückfallfiebers, vermochte man bis jetzt noch nicht ausserhalb des Organismus fortzubekommen und schliesslich muss man daran denken, dass einzelne Bakterien vielleicht sogar nur in bestimmten Species von Wirthen existiren können. Die Bakterien dieser Gruppe können sich ausserhalb des lebenden Organismus demnach wirksam nur in Dauerform, aber nicht in vegetativen Formen finden.

Der Grad der parasitischen Adaption sagt direct noch gar nichts über den Modus der Infection aus. Einzelne Arten werden von der Lunge her durch Einathmung oder Aspiration aufgenommen, andere wirken vom Darme her, andere von Wunden aus. Einzelne Arten können bestimmt in verschiedener Weise den Körper inficiren; zum Theil ist die Form, unter der die Bakterien den Körper befallen, auf den Modus der Infection von Einfluss, indem z. B. vegetative Formen von einer Wunde her inficiren, während sie im Magen durch dessen Säure geschwächt oder getödtet werden; ihre Sporen dagegen werden durch die Magensäure nicht alterirt und können deshalb vom Darme her wirken. Bei der Einathmung können die Sporen von der Lunge her eine Allgemeininfection bewirken, während die vegetativen Formen eine Pneumonie hervorrufen. Manche Parasiten bewirken am Orte des Eintritts, oft abhängig von der Form, in der sie zur Wirkung kommen, pathologische Veränderungen, während man in anderen Fällen die Veränderungen immer in bestimmten Organen trifft, welche sich

damit als loci minoris resistentiae erweisen. Diese secundären Localisationen müssen aber genau beachtet werden, um den Infectionsmodus richtig zu beurtheilen. Bei der Inhalation kann der Darm, bei der Infection vom Darm her gelegentlich die Lunge schwere anatomische Veränderungen zeigen, während an den Eintrittsstellen des Virus keine Veränderungen nachweisbar sind.

Die miasmatische Infection der Epidemiologie deckt sich nicht ohne Weiteres oder allein mit facultativem Parasitismus oder facultativem Saprophytismus und ebenso wenig ist der Begriff der Contagion an sich identisch mit obligatem Parasitismus. Das kann, aber es muss nicht der Fall sein. Untersucht man den Modus der Infection für sich und den Grad der Anpassung an die parasitische Lebensweise ebenso gesondert, so wird man oft überrascht sein zu finden, wie Epidemiologie und Bakteriologie schon jetzt sich decken, während ein einseitiger Standpunkt nur Differenzen zu zeigen scheint.

Wenn man bei den Reinkulturen die Schwierigkeit oder Leichtigkeit der Herstellung berücksichtigt, wenn man beachtet, ob die rein kultivirten Bakterien in Betreff ihres Stickstoff- und Kohlenstoffbedarfes wählerisch sind oder nicht, wenn man die Temperatur-Verhältnisse eingehend prüft, dann wird die Reinkultur zu einem epidemiologischen Experimente unter reinen Bedingungen. Der Experimentator kann sich durch diese Ermittelungen gegen einseitige contagionistische Deutungen des Thierexperimentes ganz direct schützen und unbefangen an die Beurtheilung der für das Entstehen von En- und Epidemien wichtigen anderen Momente herantreten.

So müssen z. B. Infectionskrankheiten, deren Parasiten sich so leicht kultiviren lassen, wie die von Abdominaltyphus und Cholera, bei einem so leicht nachweisbaren saprophytischen Stadium typische Beziehungen zur Aussenwelt haben, da wir nirgends solche gesetzmässige Erscheinungen als zufällige Spiele der Natur kennen. Die Thatsache des Saprophytismus allein müsste in solchen Fällen davor warnen, derartige Krankheiten als reine oder nur vorwiegend contagiöse anzusprechen.

Jeder Parasit muss einen empfänglichen Organismus als Wirth befallen, ihn berühren, um ihn krank machen zu können. Diese allgemeine Art der Berührung bezeichnete die Epidemiologie als Infection, während sie unter Contagion und Miasma besondere Unterabtheilungen schied. Die contagiöse Infection der Epidemiologie setzt bakteriologisch nichts weiter voraus, als dass die Parasiten, unabhängig von der Aussenwelt, in dem Zustande, in dem sie den Körper verlassen, virulent sind und ohne sich weiter vermehrt zu haben, in vegetativer oder Dauerform sofort direct oder indirect einen Gesunden krank machen können. Die miasmatische Infection ist bakteriologisch darauf zurückzuführen, dass die Parasiten erst ausserhalb sich in einem saprophytischen Stadium vermehren oder zur Infection besonders geeignete Dauerformen bilden, so dass sie spontan nur indirect von aussen her einen Gesunden befallen und krank machen.

Diese Infectionsmöglichkeiten und die verschiedenen Infectionswege, welche nach der gerade vorhandenen Form ausserdem wechseln können, zeigen bei verschiedenen Graden des Parasitismus und der Infection je nach den Arten der Parasiten und ihrer Wirthe Abweichungen von einander, so dass es besser ist, von einer starren Schablone abzusehen und die Vielheit der Erscheinungen in's Auge zu fassen. Der allgemeine Begriff der Infection und seine Gliederung in contagiöse und miasmische Infection, die Scheidung der Parasiten nach dem Grade der parasitischen Anpassung in Intoxicationserreger, facultative und obligate Parasiten, die Berücksichtigung der Wege der Infection und der primären und secundären Localisationen dürften vollauf genügen, um allen epidemiologischen klinischen, anatomischen und parasitologischen Thatsachen gerecht zu werden und doctrinäre Einseitigkeiten zu vermeiden. Bei so vielerlei Momenten wird kein Schlagwort alles bezeichnen können und es wird erst brauchbar durch den Begriff, den wir damit verbinden, und in dieser Hinsicht sind die alten Begriffe der Infection, Contagion und des Misma so universell brauchbar, dass man sie mit der obigen Einschränkung sogar sehr vortheilhaft verwerthen kann und so leicht nicht durch bessere ersetzen dürfte.

---

18. Untersuchung des Wassers.

Litteratur.

Hueppe: Die hygienische Beurtheilung des Trinkwassers vom biologischen Standpunkte. Journal für Gasbeleuchtung und Wasserversorgung. 1887. No. 11 ff. Diese grössere, fast monographische Bearbeitung des Gegenstandes bringt auch die genaueren Litteraturangaben.

Tiemann und Gärtner: Die chemische und mikroskopisch-bakteriologische Untersuchung des Wassers. 1889.

Ueber die Beurtheilung des Wassers handeln ferner:

Becker: Anleitung zur Untersuchung des Wassers auf Mikroorganismen. Reichs-Medicinal-Kalender.

C. Fränkel: Zeitschrift für Hygiene. 1887, II, S. 521; 1889, VI, S. 23.

C. Fränkel und Piefke: ibid. 1890, VIII, S. 1.

Fodor: Hygienische Untersuchungen. Boden und Wasser. 1882.

Gärtner: Kriterien zur Beurtheilung der hygienischen Beschaffenheit des Trink- und Nutzwassers. Referat beim VI. Internationalen Congresse für Hygiene. Wien. 1887.

Hueppe: Der Zusammenhang der Wasserversorgung mit der Entstehung und Ausbreitung von Infectionskrankheiten. Referat bei demselben Congresse. 1887.

Hueppe: Ueber die Beurtheilung centraler Wasserversorgungsanlagen vom hygienischen und bakteriologischen Standpunkte. Vortrag vom Juni 1887. Journal für Gasbeleuchtung und Wasserversorgung. 1888.

Hueppe: Ueber die Wasserversorgung durch Brunnen. ibid. 1889.

Plagge und Proskauer: Die hygienische Beurtheilung des Wassers auf Grund der Ergebnisse der chemischen und bakteriologischen Untersuchung. Zeitschrift für Hygiene. 1887. II, S. 470.

Wolffhügel: Wasserversorgung. 1882.

Für die chemische und physikalische Seite der Fragen muss ich auf die Handbücher der analytischen Chemie, Meteorologie und Experimentalhygiene verweisen: besonders Flügge, Lehrbuch der hygienischen Untersuchungsmethoden, 1881; Lehmann, die Methoden der praktischen Hygiene, 1890; Fresenius, Anleitung zur quantitativen Analyse, 6. Aufl.; wegen der Verwechselungen mit anorganischen Massen, Niederschlägen vergl. Haushofer, Mikroskopische Reactionen, 1885.

Die Entnahme des Wassers zur bakteriologischen Prüfung muss selbstverständlich mit sorgsam sterilisirten Gefässen geschehen. Man kann sich hierzu der von Chamberland angegebenen Kolben, Fig. 10 (4), S. 204 und Fig. 19, S. 231 bedienen. Die kapillar ausgezogene und zugeschmolzene Röhre b resp. a wird unmittelbar vor dem Gebrauche noch einmal durch eine Flamme gezogen, die Spitze abgebrochen und das Gefäss A resp. K durch Saugen an a

resp. h mit dem Wasser gefüllt. Hierauf wird die Spitze b resp. a abgetrocknet und wieder zugeschmolzen. Ebenso verfährt man, wenn man sich der Fol'schen Apparate bedient; hierbei wird die Röhre b, Fig. 37 (2), S. 317 derart gefüllt, dass man die zugeschmolzene Spitze p abbricht und diese Röhre durch Saugen am Ende a füllt. Auch die von Miquel für die Luftuntersuchung angegebenen Kolben lassen sich verwenden. A. Pfeiffer und Flügge haben kleine Kölbchen vorgeschlagen, deren lang ausgezogener Hals an der Flamme zugeschmolzen, zum Füllen abgebrochen und nach dem Füllen wieder zugeschmolzen wird.

Kann das Wasser direct einer Leitung entnommen werden, so ist es nach Koch am einfachsten sich sterilisirter, mit Watte verschlossener Kolben zu bedienen, welche unter Abnahme des Wattepfropfs gefüllt und nach dem Füllen sofort wieder mit Watte verschlossen werden. Müssen die Wasserproben eine kleinere oder grössere Strecke transportirt oder sollen sie mit der Post verschickt werden, so empfehle ich kleine cylindrische Fläschchen von ca. 100 ccm Inhalt zu verwenden, welche mit einem gut eingeschliffenen Glasstöpsel verschlossen werden. Dieser Glasverschluss wird noch durch Ueberziehen einer sterilisirten Gummikappe gesichert und das Ganze in sterilisirtes Papier eingewickelt. Diese Gefässe werden dann in kleine Holz- oder Blechbüchsen eingeschlossen. Dasselbe müsste natürlich auch mit den zugeschmolzenen Röhrchen geschehen. Bei weiterem Transport müssen diese Büchsen in Eis verpackt werden. Zur Entnahme aus einer Leitung wird die Gummikappe mit sterilisirten Fingern abgenommen, dann füllt man das Gefäss unter Abnahme des Glasstöpsels, setzt nach dem Füllen diesen wieder auf, zieht die Gummikappe über, trocknet ab und schliesst in die Holzbüchse ein. Zur Entnahme aus einer Quelle, einem Fluss oder Teich nimmt man die Gummikappe ab, öffnet den Glasstöpsel erst im Wasser, setzt ihn nach dem Füllen unter Wasser auf, trocknet äusserlich ab, zieht die Gummikappe über und schliesst in die Holzbüchse ein. Pfuhl[1]) gab kürzlich von Neuem eine ähnliche Anweisung für den Transport.

---

[1]) Centralblatt für Bakteriologie 1890, VIII, No. 21.

Die bakteriologische Prüfung hat zuerst die Zahl der zur Entwicklung kommenden Kolonien zu bestimmen. Die Berechnung erfolgt immer auf einen Cubikcentimeter Wasser. Je nach der Methode und der Art der Verdünnung wird eine Kolonie aus einem Keime oder aus einer Gruppe von Keimen hervorgehen können und hiernach und nach dem ursprünglichen kleineren oder grösseren Keimgehalte, wird die direct ermittelte Anzahl der Kolonien oder die pro 1 ccm berechnete Zahl mehr oder weniger genau die Zahl der entwicklungsfähigen Keime selbst angeben.

Alles was über die Vorzüge und Grenzen der einzelnen Methoden angegeben ist, wiederholt sich demnach auch bei der Wasseruntersuchung. Je länger der Versuch dauert, um so mehr wird man erwarten können, auch langsamer sich entwickelnde Arten auswachsen zu sehen. Man müsste demnach etwa bis zu 4 Wochen warten, ehe man die Versuche abbricht. Dies ist aber nicht immer möglich und die meisten Arten keimen bis zum 8. oder 10. Tage schon aus. Während manche im Wasser vorkommenden Bakterien durch die Bluttemperatur begünstigt werden, scheinen die gewöhnlichen Wasserbakterien schon bei Zimmertemperatur ihr Optimum zu haben; doch sollen nach Miquel von den bei Zimmer- und Bluttemperatur wachsenden Wasserbakterien bei Zimmertemperatur etwa 10 % in Gelatine erst zwischen 15 bis 30 Tagen auskeimen. Auf der anderen Seite können aber auch ev. solche Bakterien im Wasser vorkommen, welche erst über 50°, oder solche, welche schon bei 0° wachsen. Keine der Methoden nimmt bis jetzt auf alle diese Dinge Rücksicht, alle Methoden arbeiten mit Fehlerquellen nach der einen oder anderen Hinsicht. Zum vollen wissenschaftlichen Aufschlusse über die im Wasser vorkommenden Mikroorganismen muss man unter allen Umständen mehrere Methoden heranziehen, deren jede einzelne durch ihre besonderen Vorzüge die Mängel der anderen ausgleicht. In der praktischen Hygiene kommt er aber mehr darauf an zur Ermittelung der Zahlen sich solcher Methoden zu bedienen, deren Fehler mässige sind und welche diese Fehler dadurch compensiren, dass sie expeditiv sind. Durch die Feststellung der Zahlen werden in erster Linie technisch-hygienische Fragen über die Beziehungen des Wassers zur Umgebung und über den Betrieb der Wasserversorgungsanlagen ge-

löst und hierzu ist es meist erforderlich, möglichst viele Einzeluntersuchungen mit einem relativ hohen Grade von Genauigkeit vornehmen und wiederholen zu können. Dies wird möglich, wenn der Nährboden relativ universell verwerthbar ist, wie es für die Normalbouillon und für die Fleischwasser-Pepton-Gelatine als ausreichend sichergestellt angenommen werden darf, und wenn die Kulturen wenigstens 8 Tage bei einer Temperatur gehalten werden, welche nicht unter 15° C. herabgeht.

Koch gab schon 1881 bestimmte Mengen Wasser in verflüssigte Gelatine, mischte durch Schütteln und liess dann die Gelatine in Reagirgläsern oder flachen Schalen erstarren. Gerade diese Methode der Wasseruntersuchung war der Ausgang für die Plattenkulturen, welche seit 1883 mehr und mehr durchgebildet wurden. Bei geringem Keimgehalte des Wassers trägt man unter Abnahme des Wattepfropfs direct einen Cubikcentimeter des zu prüfenden Wassers in ca. 10 ccm bei 30 bis 35° verflüssigte Gelatine, setzt den Pfropf wieder auf und vertheilt das Wasser mit seinen Keimen durch Hin- und Herbewegen und leichtes Schütteln in der verflüssigten Gelatine. Nach dem früher Gesagten glüht man in der Regel vor dem Inficiren der Gelatine den Wattepfropf des Reagirglases zum Vernichten etwa aus der Luft heraufgefallener Keime und besonders zum Sterilisiren des Glasrandes. Dann giesst man die verflüssigte Gelatine auf Platten, indem man dieselbe gleichzeitig mit dem geglühten und wieder abgekühlten, also sicher sterilen Rande des Reagirglases oder mit einem Glasstabe oder Platindraht gleichmässig auf der Platte ausbreitet. Zum Uebertragen des Wassers verwendet man feine Pipetten, welche einen Cubikcentimeter genau zu entnehmen gestatten und welche an der oberen Oeffnung einen kleinen Wattepfropf, Fig. 29 (1 a), S. 275, tragen.

Die Pipetten sollten so fein sein, dass auf einen Cubikcentimeter 30 bis 50 Tropfen gehen. Man macht dann mehrere Platten mit verschiedenen Theilen eines Cubikcentimeter bis zu einem ganzen Cubikcentimeter, so dass sich die Platten gegenseitig controlliren. Um störende Einflüsse von verflüssigenden Arten zu vermeiden, wird ausser den Verdünnungen durch Entnahme von kleinen Theilen eines

Cubikcentimeter bisweilen die Anlage von Agarplatten nöthig, welche genau so angefertigt werden, wie es früher S. 344 angegeben ist.

Um die Luftinfection mehr zu beschränken, kann man auch die Gelatine in Kolben mit flachem Boden verflüssigen, in diesen mit dem Wasser beschicken und die verflüssigte Gelatine nach dem Mischen mit den Wasserkeimen in den Kolben zum Erstarren bringen. Ebenso beschränkt man die Luftinfection und eine nachträgliche Verunreinigung, wenn man bei Verwendung von Reagirgläsern nach Esmarch Rollröhrchen anfertigt.

Uebersteigt die Zahl der Keime pro 1 ccm 200 auch nur wenig, so kann man besonders bei Anwesenheit von viel verflüssigenden Arten nicht mehr direct mit einem Cubikcentimeter Wasser arbeiten, sondern man muss Theile eines Cubikcentimeters verwenden oder man muss, wenn die Keimzahl bedeutend grösser ist, das zu prüfende Wasser mit sterilisirtem destillirtem Wasser verdünnen, z. B. mit 10 oder 100, oder 1000 ccm. Diese Mischung muss gründlich durchgeschüttelt werden und dann entnimmt man hiervon 1 ccm oder Theile eines Cubikcentimeter, trägt dieselbe in verflüssigte Gelatine ein, mischt und legt erst hiermit die Platten, Kolben oder Rollröhrchen an.

Die Verdünnungsmethode in Flüssigkeiten erfolgt nach Miquel in der S. 312 angegebenen Weise. In der Regel muss hierzu schon bei geringem Keimgehalte eine Verdünnung vorgenommen werden, weil ein Cubikcentimeter nur etwa 30 bis 50 Tropfen enthält, während von den etwa 40 bis 50 Bouillongläsern, welche nöthig sind, 15 bis 25 % steril bleiben müssen. Nach der Verdünnung wird in jedes Glas Bouillon ein Tropfen Wasser gebracht und diese inficirten Gläser werden der Brüttemperatur ausgesetzt. Nach Miquel's Versuchen soll sich der vierte Theil aller Wasserbakterien in Bouillon bei Brüttemperatur innerhalb 24 Stunden entwickeln. Nach ungefährer Schätzung kann man also zunächst einen Vorversuch machen und berechnet nach 24 Stunden aus der Zahl der getrübten Röhrchen durch Multiplication mit 4 den erforderlichen Grad der Verdünnung unter jedesmaliger Berücksichtigung dessen, dass 25 % aller Röhrchen steril bleiben müssen. War die Verdünnung nicht genügend, so kann man am folgenden Tage die definitive Verdünnung vornehmen. Zu

diesem Zwecke war das Wasser während des Vorversuches bei 0° aufbewahrt worden. Ueber die Methode von Fol vergl. S. 314.

Meade Bolton[1]), Heraeus[2]) und Maschek[3]) hatten in einigen Versuchen keine durchgreifende Ueberlegenheit der Verdünnungsmethode in Flüssigkeiten gefunden, während Miquel[4]) in einer grösseren Versuchsreihe im Allgemeinen bei Verwendung von Flüssigkeiten allein die höchsten Zahlen erhielt. Bei Verbindung der Verdünnung in Flüssigkeiten mit der Gelatinemethode näherten sich die Zahlen den mit der Flüssigkeit allein erhaltenen, wahrend bei directen Arbeiten mit Gelatine sich die geringsten Zahlen ergaben. Hält man sich aber innerhalb der von mir schon früher[5]) angegebenen Fehlergrenzen der Gelatinemethode, welche für exactes Zählen 10 bis 100 Kolonien pro 1 ccm, für weniger exactes allenfalls 5 bis 200 Kolonien bei 15° innerhalb 8 Tagen gestattet, so stellt sich, wie ich es ebenfalls bereits früher angegeben habe, auch nach Miquel's neuen Zahlen die Sache so, dass bei geringem Keimgehalte sowohl die Ergebnisse jeder Methode für sich als auch bei Vergleich mit den anderen Methoden ziemlich übereinstimmen, dass aber die Abweichungen der verschiedenen Methoden unter einander und jeder Methode für sich in dem Maasse grösser werden, als die Zahl der Keime pro 1 ccm 100 überschreitet.

Arloing[6]) hat zum Zählen der Keime einen höchst complicirten Apparat als „analyseur bactériologique pour l'étude des germes de l'eau“ angegeben, dessen Prinzip ich wenigstens kurz angeben will. Eine quadrirte Glasplatte wird mit einer Schicht Nährgelatine beschickt, welche erstarrt. Unter Schutz gegen Luftinfection lässt man aus einer graduirten Pipette ein Tropfen des zu prüfenden und ev. verdünnten Wassers auf die Mitte eines Quadrates der festen

---

1) Zeitschrift für Hygiene 1886, I, S. 76.

2) ibid. S. 193.

3) Jahresbericht der Ober-Realschule in Leitmeritz 1887.

4) Annuaire de l'observatoire de Montsouris pour l'an 1888.

5) Journal für Gasbeleuchtung und Wasserversorgung 1887, No. 17, S. 540; S. A. S. 48.

6) Arch. de Physiol. norm. et pathol. 1887, Bd. 19, S. 273; Revue d'hygiène 1888, X, No. 6.

Gelatine auffallen. Dann wird die Gelatineschicht um ein Quadrat verschoben (mittelst eines besonderen Triebrades) und nun wird der zweite Wassertropfen auf die Mitte dieses zweiten Quadrates gebracht und so weiter, bis jedes Quadrat in der Mitte mit einem Tropfen Wasser versehen ist. In einer Glaskammer verdunsten die Wassertropfen schnell und etwa in den einzelnen Tropfen befindlich gewesene Keime sind in der Mitte je eines besonderen Quadrats isolirt deponirt. Hierdurch sind die Wasserkeime sofort von etwaigen Luftkeimen auseinanderzuhalten, weil die letzteren unregelmässig niederfallen müssen. Dieser etwaige Vorzug ist aber durch ungeheuere Unbequemlichkeiten erkauft und vor Allem verzichtet diese Methode auf das Erstarren der verflüssigten Gelatine als Isolirungsmittel, wie dasselbe bei der directen Mischung in Gelatine und bei der Verbindung der Verdünnung in Flüssigkeiten mit der Gelatinemethode zur Wirkung kommt. Durch diesen Verzicht wird die Methode geradezu als ein Rückschritt charakterisirt und dies um so mehr, als die Luftinfection bei Verwendung von Kolben oder Rollröhrchen ebenso sicher und viel bequemer ausgeschlossen werden kann.

Zum Zählen der entwicklungsfähigen Keime eines Wassers wird man sich in der Regel mit der Gelatinemethode begnügen dürfen und zwar derart, dass man bei geringem Keimgehalte einen Cubikcentimeter oder Theile eines solchen direct in je 10 ccm Gelatine vertheilt oder dass man bei grösserem Keimgehalt eine Verdünnung mit sterilisirtem Wasser vorausschickt. Die Kulturen müssen 8 Tage bei mindestens 15° C. gehalten werden.

Die Plattenmethode mit Gelatine ist um so wichtiger, als es sich stets um Berücksichtigung der Zahl und der Arten handelt, weil kein Nährboden so schnell die differenten Arten erkennen lässt wie die Gelatine. Besonders wachsen alle facultativen Parasiten, darunter Cholera- und Typhusbakterien, in der Gelatine so charakteristisch, dass man dieselben entweder unmittelbar erkennen kann, oder dass doch die Aufmerksamkeit sicher und schnell auf etwaige verdächtige Arten gelenkt wird, welche man dann durch weitere Kulturen auf oder in anderen Medien oder durch Thierversuche genauer zu ermitteln hat. Uebrings sind im Wasser durch Koch

Cholerabakterien, durch Michael, Chantmesse, Widal, Thoinot, Beumer, Kowalski auch Typhusbakterien nachgewiesen worden.

Diese zuerst von mir scharf formulirte Forderung der jedesmaligen Mitberücksichtigung der Arten fängt in den letzten Jahren an allmälich mehr[1]) beachtet zu werden. Dies ist sehr wichtig, weil es sich sehr häufig bei Wasseruntersuchungen nicht um den directen Nachweis pathogener Bakterien, sondern darum handelt, die Beziehungen zur Umgebung, z. B. zum Erdboden, festzustellen. Auch hierüber orientirt die Gelatinemethode am schnellsten. In diesem Falle wird die Infectionsmöglichkeit (Hueppe) aus der Zu- oder Abnahme der Arten und der Keimanzahl des Wassers beurtheilt, indem man Brunnen, Quellen, Filter vor und nach dem Versuche vergleichend prüft. Für Einzelheiten nach dieser Richtung vergleiche die Arbeiten von Hueppe, Plagge und Proskauer, C. Fränkel und Piefke.

Soll das Wasser in einem technischen Betriebe verwerthet werden, so versteht es sich wohl nach den früheren Ausführungen von Brefeld und Koch und nach den bereits in den früheren Auflagen von mir gemachten Darlegungen von selbst, dass die Methode dem concreten Falle angepasst wird. Bei Verwendung im Molkereiwesen muss man wissen, ob das Wasser Bakterien oder Pilze enthält, welche die Milch alteriren. Soll das Wasser in der Brauerei verwendet werden, so muss man wissen ob das Wasser Keime enthält, welche die Bierwürze oder das Bier beeinflussen. Im letzteren Falle muss man selbstverständlich statt und neben der neutralen oder schwach alkalischen Bouillon oder Nährgelatine entweder Bierwürze oder Würzgelatine sowohl zum Trennen der Keime als zur Prüfung ihrer Wirkungen verwenden. Eine derartige Untersuchung hat Hansen[2]) vor einiger Zeit veröffentlicht, wobei er merkwürdiger Weise die ganz selbstverständliche Anpassung an diesen Fall als eine „eigene Methode“ hinstellt.

Bis jetzt ist keine besondere Rücksicht darauf genommen worden,

---

[1]) cf. z. B. Migula, Centralblatt für Bakteriologie 1890, VIII, No. 12.

[2]) Zeitschrift für das gesammte Brauwesen 1888; ferner Jörgensen, Centralblatt für Bakteriologie 1890, V, No. 12 und Hueppe ibid. 1890, VI, No. 1.

dass das Wasser auch streng anaërobe Arten enthalten kann. Im Wasser selbst kommt dieser Fehler weniger in Betracht als im Schlamme am Grunde des Wassers. Doch muss man bisweilen auch anaërobiotische Versuche in der früher geschilderten Weise machen.

Directe Thierversuche mit dem zu prüfenden Wasser kommen gelegentlich in Frage und Untersuchungen von Pasteur, Gaffky, Fodor haben gezeigt, dass Wasser bisweilen septikaemische Organismen enthält. Die Thierversuche als Methode der Reinkultur zum Isoliren pathogener Arten von nicht pathogenen ist jedoch beim Wasser selten erforderlich, weil leider gerade bei einigen der wichtigsten Arten, wie Typhus- und Cholerabakterien, der Thierversuch in dieser Weise überhaupt nicht gelingt. In der Regel tritt der Thierversuch erst später ein, wenn es sich um die Feststellung der Wirkungen anderweitig vorher reinkultivirter Arten handelt.

Cohn hatte früher versucht die Güte eines Wassers nach der Art und Stärke der sich entwickelnden Bakterientrübungen und Membranen zu beurtheilen. Diese Methode ist ganz verlassen worden. Ich halte es oft für ganz unerlässlich diese alte Methode in etwas veränderter Form zu rehabilitiren. Unsere Methoden lehren uns nicht alle Arten von Mikroorganismen kennen, welche ein Wasser enthält und die man zur Beurtheilung des Wassers oft kennen muss. Ueberlässt man ein Wasser sich selbst, so werden die Keime nach dem Chemismus des Wassers und den Nebenbedingungen sich neben und nacheinander an der Zersetzung des Wassers betheiligen und man wird Arten und Formen finden, welche bei der Verdünnungsmethode mit Gelatine und Bouillon der Beobachtung entgehen. Auf diese Weise habe ich Crenothrix polyspora, Lyngbya ochracea, Beggiatoen und andere für spezielle Fälle zur Beurtheilung wichtige Mikroorganismen einige Mal gefunden, wo die Kulturmethoden mich ganz im Stiche gelassen hatten. Ich setze in der Regel 3 Kolben nebeneinander an. Der eine bleibt, zu einem Drittel gefüllt, nur mit Watte verschlossen stehen; ein anderer wird ganz gefüllt und mit Gummipfropf fest verschlossen und durch den dritten wird wochenlang langsam, aber stetig Luft durchgesaugt.

Die zur Entwicklung gekommenen Kolonien müssen im hängenden Tropfen und in Deckglastrockenpräparaten mikroskopisch ge-

prüft werden. Ausserdem muss von dem zu prüfenden Wasser sofort und öfters im Verlaufe der Umsetzungen eine ebensolche mikroskopische Prüfung von der Oberfläche, dem Innern und dem Bodensatz vorgenommen werden. Viele im Wasser vorkommenden Mikroorganismen, wie Diatomeen, Algen, Infusorien, werden bis jetzt nur auf diesem Wege erkannt.

Die Abwässer von Städten, Häusern, Fabriken werden wie das Trink- und Nutzwasser untersucht. Da derartige Wässer in der Regel Millionen von Keimen enthalten, müssen den Gelatinekulturen sehr starke Verdünnungen mit sterilisirtem distillirtem Wasser vorausgeschickt werden.

Regen und Schnee sind zu Beginn keimreicher als später, so dass auch hier bisweilen Verdünnungen vorausgehen müssen. Zum Auffangen kann man sich eines besonderen Apparates nach Miquel bedienen. Denselben Zweck erfüllt ein hohes cylindrisches Glas, welches mit Wattepfropf versehen und gut sterilisirt ist. Der Wattepfropf wird im Freien abgenommen und erst wieder aufgesetzt, wenn eine zur Untersuchung genügende Menge Regen oder Schnee im Glase vorhanden ist.

Auch Hagelkörner können nach Bujwid[1]) bisweilen sehr zahlreiche entwicklungsfähige Keime enthalten. Da man die Hagelkörner selten direct auffangen kann, muss man dieselben mit sterilisirtem Wasser gründlich abwaschen und dann in sterilisirtem Reagirglase sich auflösen lassen. Die Kulturen werden dann mit diesem Schmelzwasser in der früheren Weise angestellt.

Eis muss mit einem sorgfältig gereinigten Hammer in kleinere Stücke zerschlagen werden. Diese Stücke werden mit sterilisirtem Wasser gründlich abgespült und in einem sterilisirten Gefäss zum Schmelzen gebracht. Nach gleichmässigem Mischen der Keime in dem Schmelzwasser entnimmt man von demselben abgemessene Mengen zum Vertheilen in der verflüssigten Gelatine. Oft muss man aber auch hier noch eine Verdünnung mit sterilisirtem Wasser vorausgehen lassen. Die Untersuchungen von C. Fränkel[2]), M. Prudden[3])

[1]) Centralblatt f. Bakteriologie 1888, III, No. 1.

[2]) Zeitschrift f. Hygiene 1886. I, S. 302.

[3]) Medical Record 1887, No. 13 und 14.

und Bordoni-Uffreduzzi[1]) haben gezeigt, dass das Eis, je nach dem Grade der Reinheit des Wassers, wenig oder viel Keime enthalten kann. Jedes Frieren setzt die Zahl der Keime des Wassers herab, ohne aber zu einer vollständigen Reinigung des Wassers zu führen. Plötzliches Frieren und rapider Wechsel von Aufthauen und Frieren tödtet viel mehr Keime als die in der Natur gewöhnliche Art des langsamen Frierens und Wiederaufthauens. Selbst tiefere Temperaturerniedrigungen wirken im letzteren Falle nicht so schädigend als mässigere Temperaturen im ersteren Falle.

---

19. Untersuchung von Boden und Schlamm.

Litteratur:

Zur Orientirung eignet sich R. Sachsse's Referate über die Mikroorganismen des Bodens: Chemisches Centralblatt 1889, II, S. 169. 225.

Die Entnahme des Bodens aus oberflächlichen Schichten erfolgt derart, dass man mit einem sterilisirten Löffel oder Spatel Proben in sterilisirte, mit Wattepfropf versehene Gläser bringt. Bei grösseren Tiefen bedarf man eines Erdbohrers, von denen ein von Müncke nach C. Fränkel[2]) hergestellter, den meisten Anforderungen entsprechen dürfte, weil derselbe einen verschliessbaren Ausschnitt über dem Bohrgewinde trägt. Der Bohrer wird geschlossen eingeführt, bei der gewünschten Tiefe wird der Auschnitt, welcher einen scharfen Rand besitzt, geöffnet und dann die Erde entnommen und nun wird vor dem Herausziehen des Bohrers der Ausschnitt wieder geschlossen. Auf diese Weise ist man sicher die Erdproben wirklich der gewünschten Tiefe zu entnehmen.

Zur Feststellung der Thatsache, dass in einem Boden entwicklungsfähige Keime vorhanden sind, kann man nach Koch[3])

[1]) Centralblatt f. Bakteriologie 1887, II, No. 17.
[2]) Zeitschrift f. Hygiene. 1887, II, S. 521.
[3]) Mittheilungen. 1881, I, S. 34.

Erdbröckchen auf erstarrte Gelatine, welche sich auf Objectträgern oder Platten befinden, aufstreuen. Etwas besser erreicht man den Zweck, wenn man die Bodenprobe lufttrocken werden lässt, dieselbe dann in einer Reibschale fein verreibt und diese feineren Partikel auf eine noch nicht ganz fest erstarrte, sondern noch eben zähflüssige Gelatine aufstreut.

Eine Zählung der Keime und eine auch nur annähernde Orientirung über die Arten ist aber auf diesem Wege nicht möglich und man muss deshalb die Mischung der Erde mit dem Nährmedium inniger gestalten. Dies hatte Miquel 1882 dadurch erreicht, dass er gewogene Mengen Erde mit abgemessenen Mengen Wasser mischte und diese keimhaltige Flüssigkeit nach den Regeln der Verdünnungsmethode in Flüssigkeiten in Bouillon fractionirte.

Ich selbst hatte 1885 versucht, die Vortheile der Plattenkulturen und der Wassermethode auch für den Boden zugänglich zu machen und ich[1]) habe damals bereits zwei hierzu brauchbare Methoden angegeben, welche später auch von anderer Seite als ganz neue Methoden nochmals angegeben wurden. Die eine Methode besteht darin, dass man Partikel Erde „in die noch im Reagirglase befindliche, verflüssigte Gelatine eintragen, durch Schütteln vertheilen und dann die so inficirte Gelatine auf die Platte" ausgiessen soll. Diese Methode ist später von C. Fränkel[2]) sehr gerühmt worden, mit dem Zusatze, dass man die Erdpartikel mit einem sterilen starken Platindraht gründlich zerkleinern soll und mit der weiteren Modification, dass auch hier statt des Ausgiessens auf Platten die flüssige Gelatine in den Reagirgläsern nach Esmarch ausgerollt wird. Reimers[3]) nimmt die Mischung so vor, dass er $^1/_{10}$ ccm Erde in einem sterilisirten Achatmörser mit verflüssigter erwärmter Gelatine übergiesst und dann diese Mischung mit sterilisirtem Pistill aufs feinste zerreibt. Körber[4]) verreibt die Erdprobe mit sterilisirtem,

---

[1]) Dieses Handbuch. 3. Aufl., S. 227.

[2]) Zeitschrift f. Hygiene. 1887, II, S. 527.

[3]) ibid. 1889, VII, S. 307.

[4]) vergl. O. Eberbach: Ueber das Verhalten der Bakterien im Boden Dorpats. Dissert. 1890.

trockenem Sand und lockert dadurch die Masse, ehe er sie in Gelatine überführt.

Diese Methode des unmittelbaren Arbeitens in Gelatine ist für das Feststellen der Arten wohl die bequemste und verhältnissmässig zuverlässigste. Da die meisten Kulturböden aber enorme Mengen von Keimen enthalten und eine Platte oder ein Rollröhrchen nur eine verhältnissmässig geringe Zahl von Kolonien enthalten darf, wenn man die Kulturen, wie es durchaus erforderlich ist, 8 Tage (nicht blos 48 Stunden!) bei 15° halten will, so enthalten schon die kleinen Erdproben, welche man mit einer Platinöse einträgt, meist zu viel entwickelungsfähige Keime, um in einem Röhrchen die Beobachtung in einer zur Feststellung der Zahl genügenden Weise sicher zu Ende zu führen. Zur Feststellung der Arten macht man vom ersten Röhrchen eine oder mehrere successive Fractionen nach Koch S. 341.

Mein zweites Verfahren l. c. besteht darin, dass man eine bestimmte Menge Boden in eine grössere Menge sterilisirtes, destillirtes Wasser einträgt, die Erde tüchtig zerreibt, ausschüttelt und so die Keime in das Wasser überführt. Von diesem keimhaltigen, trüben Wasser behandelt man bestimmte Mengen nach den bei der Wasseruntersuchung verwertheten combinirten Methoden, S. 350 und S. 459, indem man 1 ccm oder Theile eines solchen in verflüssigte Gelatine einträgt, vertheilt und dann die keimhaltige Gelatine auf Platten ausgiesst. Ohne Aenderung dieses Prinzips kann man selbstverständlich die Gelatine auch in Kölbchen oder Reagirgläsern zum Erstarren bringen. Diese Methode ist später von Beumer[1]) als neu und im Gegensatze zu meiner Methode nochmals angegeben worden, trotzdem Beumer meine Methode citirt!

Während Miquel und ich als Bodeneinheit 1 gr Erde gleich dem Gewichte von 1 ccm Wasser angegegeben haben, hat Beumer vorgeschlagen, als Einheit 1 ccm Erde zu wählen. Die Volumeneinheit dürfte sich im Allgemeinen mehr empfehlen, als die Gewichtseinheit, wodurch jedoch am Prinzip meiner Methoden nichts geändert wird. Beumer trägt die Erdproben mit einem sterilisirten

[1]) Deutsche med. Wochenschrift. 1886, No. 27.

30*

Spatel in kleine flache Glasgefässe ein, welche glatt gestrichen bis zum Rande gerade dem Volumen von einem Cubikcentimeter Wasser entsprechen; C. Fränkel verwendet bequemer Platinlöffelchen von $^1/_{50}$ ccm. Mit dieser von Beumer-Fränkel angegebenen Modification und mit ganz unbedeutenden Abweichungen, ist diese von mir zuerst angegebene Verbindung der Verdünnungsmethode mit der Gelatine-Plattenmethode auch von Smolenski[1]) und Klementieff[2]) verwendet worden.

Die grosse Zahl der Keime in den meisten Bodenarten bringt schon an sich unvermeidliche Fehler. Die Lokalisationen im Boden und die Beschaffenheit der Bodenarten sind so ungeheuer wechselnd, dass man bei keiner Entnahmeweise auch nur annähernd gleiche Verhältnisse wie beim Wasser herstellen kann. Die Erde muss ausserdem selbstverständlich sofort verarbeitet werden, weil sonst eine Vermehrung der Keime stattfindet. Dies ist für das Zählen oft recht lästig, weil lufttrockener Boden sich am gleichmässigsten vertheilen lässt. Das Trocknen arbeitet zwar dadurch, dass hierbei manche Bakterien eine Einbusse an Entwicklungsfähigkeit erleiden oder absterben, der Vermehrung etwas entgegen, aber in uncontrollirbarer Weise. Wählt man den gewachsenen Boden mit seinem schwankenden Feuchtigkeitsgehalt, so bleiben die Keime in dem Grade der Entwicklungungsfähigkeit, den sie in der Erde selbst hatten, aber es gelingt, auch wenn man mit sterilisirtem Glasstabe oder Messer oder Platindraht die Erdpartikel zerdrückt, ein Vertheilen der Keime nie so gut, wie bei dem vorherigen Trocknen. Man kann diesem Fehler nach dem Verfahren von Körber etwas begegnen. Zwischen diesen beiden Fehlern wird sich die Bodenuntersuchung immer bewegen, welche Methode man auch wählen mag. Die Fehler der Bodenuntersuchung sind bei allen Methoden stets grösser als die Fehler der Wasseruntersuchung. Die grosse Zahl der Keime in kleinen Bodenmengen wird etwas verständlich, wenn man sich mit Soyka[3]) daran erinnert,

[1]) Wratsch, 1887, No. 6—11. Referat von Heydenreich in Zeitschrift f. w. Mikroskopie 1887, IV, S. 252.

[2]) Dissert. 1887. Nach dem Referat von Heydenreich.

[3]) Fortschritte der Medicin 1886, IV, No. 9.

dass jedes kleinste Korn und jeder kapillare Raum im Boden Isolirungsmöglichkeiten bieten, wie wir sie auf kleinem Raume künstlich nur annähernd durch Verwendung fester Kulturmedien gewinnen können.

Unter Berücksichtigung dieser grossen Fehler der einzelnen Methoden verfahre ich stets derart, dass ich 1) einerseits Platinösen mit Erde direkt in Gelatine eintrage und die Erdpartikel in der Gelatine mit Platindraht oder Glasstab sorgfältig zerkleinere, dann die Keime durch Schütteln mische und vertheile und nunmehr Platten, Kölbchen oder Rollröhrchen anlege. Von dieser ersten Kultur wird gewöhnlich eine I. bis ev. III. Verdünnung gemacht. Diese Kulturen dienen nur zur Orientirung und Bestimmung der Arten. 2) Trage ich aber stets 1 ccm Erde in 1 Liter sterilisirtes, destillirtes Wasser ein. Zuerst wird der Boden mit etwas Wasser mit sterilisirtem Pistill ganz fein zerrieben und dann allmählich der ganze Liter Wasser zugegeben resp. mit einem Theil dieses Wassers die Reibschale sorgfältig nachgespült; dann schüttele ich mehrmals in Intervallen gründlich und entnehme von dem gleichmässig trüben Wasser 1 ccm oder Theile eines solchen, welche ich in Reagirgläser oder flasche Kölbchen mit verflüssigster Gelatine eintrage. Bisweilen muss sogar von der ersten Mischung noch eine zweite Verdünnung angelegt werden, indem 10 ccm des durchgeschüttelten gleichmässig trüben Wassers in ein zweites Liter sterilisirtes Wasser eingetragen werden; erst von dieser zweiten Verdünnung werden dann die definitiven Kulturen angelegt. Bei diesem Vorgehen machen sich die Einwände von C. Fränkel gegen die Verdünnung mit Wasser nicht bemerkbar. 3) Soll das erste qualitative Verfahren zur Zählung verwendet werden, so wende ich jetzt das Verfahren von Körber an um die abgemessene Bodenmenge mit abgemessener Menge sterilisirtem Sande innigst zu verreiben und zu mischen, trage dann von dieser Mischung kleine abgemessene Mengen in Gelatine ein.

Die Verdünnungsmethode in Flüssigkeiten muss selbstverständlich von Mischungen der Erde in sterilisirtem destilirtem Wasser ausgehen und wird ebenso ausgeführt, wie die Analyse eines keimreichen Wassers.

Schon bei diesen relativ einfachen Methoden werden weitere Fehler dadurch begangen, dass im Boden Arten existiren, welche nach Fischer bereits bei 0° wachsen, während nach Globig andere Arten nicht unter 50° wachsen. Um alle Arten kennen zu lernen, muss auch hierauf Rücksicht genommen werden und für diese hohen Temperaturen muss man Erdartikel oder Tropfen des mit Erde inficirten Wassers auf Kartoffeln bringen, welche bei 50° gehalten werden. Bei den vielen Pilzen und Hefen, welche der Boden zu enthalten pflegt, sind auch sauere Medien, z. B. Bierwürze, zu verwenden.

Ein noch gröberer Fehler ergiebt sich daraus, dass im Boden und Schlamm, welcher ebenso wie der Boden behandelt wird, viele anaërobe Arten vorhanden sind. Diese kann man zum Theil durch Massenkulturen bei Luftabschluss vorbereiten, zum Theil kann man dieselben direct in Rollröhrchen kultiviren. Die Kultivirung der wichtigsten, gelegentlich vielleicht aller in einem Boden oder Schlamm vorhandenen Arten gelingt bei grosser Sorgfalt unter Berücksichtigung aller dieser Fehler oft recht gut, die Fehler für die Feststellung der Zahl der entwicklungsfähigen Keime pro 1 ccm bleiben aber stets so gross, dass die Zahlen wohl nie die Genauigkeit haben wie bei einer Wasseruntersuchung.

Mit allen diesen Methoden können aus dem Boden nur facultative Parasiten oder facultative Saprophyten kultivirt werden.

Streng obligat parasitische Bakterien können sich im Boden nur in Dauerform finden und man kann dieselben aus dem Boden wohl nie direkt kultiviren. In der Regel bedarf es des Umweges durch die Infectionsmethode, um ein möglichst reines Ausgangsmaterial für Blutserumkulturen zu gewinnen. Man bringt von dem Boden in eine oder mehrere Hauttaschen eines Thieres und inficirt dann erst mit dem Eiter, dem Blute oder Gewebssafte der erkrankten Thiere andere. Nach einigen Uebertragungen werden dann die Thiere in ihren Geweben oder im Blute Reinkulturen der malignen Art darstellen und man kann dann in der früher geschilderten Weise Blutserumkulturen anlegen. In dieser Weise arbeitete Nicolaier über Tetanus. Auch bei den anaërobiotischen Bacillen des malignen Oedems führt dieser Weg bei Meerschweinchen

schnell zum Ziele, die Reinkulturen aus dem Gewebe macht man dann, wie es schon S. 324 geschildert wurde.

Durch Schlösing und Müntz[1]), später besonders durch Warington[2]) war experimentell erwiesen worden, dass im Boden das aus dem Zerfalle organischer Substanzen sich bildende Ammoniak durch die Thätigkeit von Bakterien in Salpetersäure übergeführt werden kann und Müntz und Marcano[3]) führen die Bildung der grossen Salpeterlager in den Tropen auf dieselbe Ursache zurück. Die Oxydation des Kohlenstoffs der organischen Substanzen zu Kohlensäure wurde von Wollny[4]) gleichfalls experimentell auf Mikroorganismen zurückgeführt. Umgekehrt findet in den Bodenschichten mit Beschränkung des Luftzutritts eine Reduction der Nitrate durch Bakterien statt, wie Gayon und Dupetit[5]) fanden, wobei bald nur Nitrite, bisweilen aber Stickstoff, Ammoniak, Stickoxydul sich bilden. Diese Experimente stellt man derart an, dass man in sterilisirte schwach alkalische Nährlösungen oder Abwässer, welche Ammoniaksalze, Nitrite resp. Nitrate enthalten, eine Spur Erde einträgt, während man zur Controlle in andere Gläser Erde bringt, welche durch mehrstündiges Erhitzen bei 150 bis 160° sterilisirt war. Zu den Reductionen wendet man in der Regel die Versuchsanordnung über Anaërobiose an, doch ermittelten Heräus, Lindenborn und Holschewnikoff dass einige der im Boden und Schlamm vorkommenden Reductionen auch aërob vor sich gehen können. Heräus[6]), Leone[7]), Celli und Marino-Zuco[8]), P. Frankland[9]), Winogradsky[10])

---

[1]) Comptes rendus. Bd. LXXVII, 1877, S. 203 und 353; Bd. LXXXIV, S. 301; Bd. LXXXIX, S. 891.

[2]) Journal of the chemical Society. 1884, S. 642; 1888, S. 727.

[3]) Comptes rendus 1885, Bd. 101, S. 65.

[4]) Landw. Versuchsstationen, Bd. XXV, 1880, S. 390.

[5]) Comptes rendus, 1882, Bd. LXXXXV, S. 644 und S. 1365.

[6]) Zeitschrift f. Hygiene, 1886, I, S. 193.

[7]) Gazetta chimica Italiana, 1886, B. 16.

[8]) Rendiconti della R. Accademia dei Lincei, 1886, S. 519.

[9]) Journal of the chemical Society, 1888, Bd. 53, S. 373.

[10]) Annales de l'Institut Pasteur, 1890, IV, S. 213 und 760; 1891, V, S. 92.

gelang es, diese Oxydationen und Reductionen durch Reinkulturen nachzuweisen.

Hierdurch wurden die ersten positiven Grundlagen für das biologische Verständniss der bis dahin rein hypothetischen Grundwassertheorie geliefert.

Der directe Nachweis, dass im Boden auch pathogenetische Organismen, resp. deren Sporen vorhanden sein können, wurde 1881 von Pasteur und Koch[1]) für die Bacillen des malignen Oedems gebracht. Nicolaier[2]) zeigte durch Thierversuche, dass sich in der Erde häufig eine Bacillenart findet, welche bei Mäusen, Kaninchen und Meerschweinchen tödtlichen, auf andere Thiere übertragbaren Tetanus hervorruft. Macé[3]) fand einmal die Typhusbacillen in einem Bodenheerde.

Trotz der groben Fehler für die Feststellung der Zahl der Bodenkeime und trotzdem die Arten nur unter Verwendung der verschiedenartigsten Methoden leidlich ermittelt werden können, sind die expeditiven Methoden praktisch von grösster Bedeutung. Die directe Methode in Gelatine und die Verbindung der Gelatinemethode mit der Verdünnung, bei denen die Kulturen 8 Tage bei Zimmertemperatur von mindestens 15° und die Verdünnungsmethode in Flüssigkeit, bei denen die Bouillonkultur mehrere Wochen lang bei Bluttemperatur gehalten werden, genügen, um die hygienisch wichtigen Beziehungen des Bodens zum Wasser und zur Luft, besonders soweit sie zu technischen Beurtheilungen wichtig sind, leidlich klar zu stellen.

Im Boden findet von oben nach unten eine Abnahme der Zahl und der Arten statt. In Folge dessen muss der Gehalt des Grundwassers an entwicklungsfähigen Keimen je nach der Höhe der ersten undurchlässigen Schicht an sich sehr schwanken. Dasselbe ist der Fall, wenn das Grundwasser durch Brunnen erschlossen wird. Das Auspumpen eines Brunnens nimmt die Filtrationskraft des Bodens stärker in Anspruch und muss demnach die Zahl und

---

[1]) Mittheilungen aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. I, 1881, S. 56.
[2]) Ueber infectiösen Tetanus. Deutsche med. Wochenschrift 1884, No. 52.
[3]) Comptes rendus, 1888, Bd. 106, S. 1564.

Arten der Bakterien im Wasser herabsetzen, wenn die Brunnenwände richtig angelegt sind. Ebenso wie der gewachsene Boden, wirken auch künstliche Sandfilter auf Mikroorganismen und sie setzen sowohl die Zahlen als Arten herab. Diese Beziehungen ermittelt man am bequemsten durch directe Untersuchungen des Bodens und Wassers in Gelatine oder durch Verbindung der Verdünnung in sterilisirtem Wasser mit der Platten-Methode. Die Fehler dieser Methoden sind in diesem Falle ziemlich irrelevant, weil immer vergleichbare Dinge unter gleichen Bedingungen geprüft werden, so dass man hiermit über die „Infectionsmöglichkeit" des Wassers wichtige Anhaltspunkte gewinnt.

Unter Berücksichtigung dieser Filtrationskraft des Bodens kann man durch dauernd hohen Keimgehalt oder durch besondere Arten von Bakterien sehr oft ungehörige Verbindungen des Grundwassers, z. B. eines Brunnens mit oberen Bodenabschichten oder mit seitlichen Unrathquellen, wie Versitzgruben, ermitteln.

Wanderungen der Mikroorganismen im Boden können durch Risse, Spalten oder Gänge von Wühlthieren begünstigt werden, weil hierdurch directe Verbindungen der Oberfläche mit tieferen Bodenabschnitten zu Stande kommen.

Nach Soyka[1]) kann auch die kapillare Steigung des Wassers im Boden Bakterien aus der Tiefe in die Höhe bringen. Ein Glasrohr von 1,5 cm Durchmesser und 30 bis 70 cm Länge, steckt derart in einem birnförmigen Glasgefäss, dass ca. 3 cm des Glasrohres in das Gefäss hineinreichen. Der auf diese Weise am Grunde des Gefässes, zwischen der Wand desselben und dem Glassrohre befindliche Raum dient zur Aufnahme von Nährlösungen oder Nährgelatine, welche bis an den Rand des Glasrohres reichen. Oben verengt sich das birnförmige Gefäss und erhält an dieser Stelle einen Watteverschluss. Die Röhre wird derart mit Erde oder Glaspulver gefüllt, dass sie oben eine Kuppe bildet, so dass bei einer Erschütterung oder Neigung Partikel von dieser Erde in die Nährlösung fallen können. Der Apparat wird durch Dämpfe sterilisirt und nach dem Erkalten

---

[1]) Prager medicinische Wochenschrift 1885, No. 28; Zeitschrift f. Hygiene 1887, II, S. 97.

mit dem unteren Ende in eine Flüssigkeit eingesenkt, welche eine bestimmte Art von Mikroorganismen in grosser Zahl enthält. Diese Flüssigkeit steigt erst rapide, dann langsamer im Verlaufe mehrerer Tage kapillar durch die Erdschicht bis zur freien Kuppe empor. Mit der Flüssigkeit steigen aber auch unter Umständen Organismen empor und wenn man dann durch leichtes Schütteln etwas Boden von der Kuppe auf die Nährlösungen fallen lässt, entwickeln sich in denselben diese Organismen in Reinkulturen.

Dass dies bei sehr starkem Bakteriengehalt und scharfem feinen Sande möglich ist, haben Schottelius und ich bestätigt. Im Allgemeinen findet aber unter natürlichen Verhältnissen ein derartiger Transport, wie A. Pfeiffer[1]) unter Aenderung der Versuchsbedingungen fand, nicht statt und die Filtrationskraft des Bodens hindert weite Wanderungen der Organismen im Boden und häuft die Mikroorganismen in den oberen Bodenschichten an, so dass je nach der vorausgegangenen Behandlung des Bodens bei 4 bis 6 Metern in der Regel schon keine entwicklungsfähigen Keime mehr nachweisbar sind und das Grundwasser keimfrei ist.

Ein Transport von Mikroorganismen könnte im Boden auch dadurch bewirkt werden, dass Thiere bakterienhaltigen Boden als Nahrung aufnehmen und dass deren an anderen Stellen ausgeschiedene Excremente Keime im entwicklungsfähigen Zustande enthalten. Bei dem grossen Einflusse, welchen Regenwürmer nach Hensen und Darwin auf die Bewegung des Bodens bis zu einigen Fuss Tiefe ausüben, hatte Pasteur die Regenwürmer bei dem Transporte der Milzbrandsporen aus der Tiefe an die Oberfläche betheiligt gehalten. Koch hat für diesen speciellen Fall gezeigt, dass die Regenwürmer mit diesem Transport wenig zu thun haben, weil sich die Milzbrandsporen bereits an der Oberfläche befinden, also nicht aus der Tiefe an die Oberfläche zu transportiren sind.

---

1) Zeitschrift f. Hygiene 1886, I, S. 394; 1887. II, S. 239.

20. Untersuchung der Luft.

Litteratur.

Miquel: Les Organismes vivants de l'atmosphère 1883; Annuaire de l'observatoire de Montsouris 1879 ff.
Petri: Zusammenfassender Bericht über Nachweis und Bestimmung der pflanzlichen Mikroorganismen in der Luft. Centralblatt für Bakteriologie 1887 II, No. 5. u. 6.
G. Roster: Il pulviscolo atmosferico ed i suoi microorganismi 1885.

Pasteur liess, nicht um den Gehalt der Luft an Keimen zahlenmässig zu ermitteln, als vielmehr um ein für alle Mal sicher zu stellen, ob überhaupt Bakterien in der Luft sind, Luft durch Schiessbaumwolle streichen, löste dann die Schiessbaumwolle in Aether und untersuchte die Lösung mikroskopisch. Miquel[1]) versuchte, unter Verbesserung früherer Apparate, die Mikroorganismen der Luft zu fixiren. In einer nach unten offenen Glocke ist ein hohler Kegel eingeschraubt, der an der Spitze eine feine Oeffnung besitzt; dieser Oeffnung gegenüber befindet sich in der Glocke ein mit 2 Theilen Glycerin und 1 Theil Glycose bestrichener Objectträger. Wird die Luft in die Glocke aspirirt, so muss dieselbe an dem Objectträger vorbeistreichen und giebt ihren Staub an die klebrige Flüssigkeit ab, welche dann direct mikroskopisch untersucht werden kann. Miquel verwendete derartige Platten zum Theil zum Zählen von Pilzsporen und Hefen, aber nicht zum Zählen von Bakterien. Für Bakterien verwendete er sie nur, um zu ermitteln, in welcher Form dieselben in der Luft vorhanden sind, da sie in der klebrigen Flüssigkeit fixirt werden, ohne sich aber vermehren zu können. Das noch bessere Pinzip des Fixirens der Bakterien dadurch, dass man dieselben sich in der Form senken lässt, wie sie in der Luft vorhanden sind, verwendete Koch[2]) derart, dass er Schalen mit Nährgelatine oder Kartoffelscheiben, welche sich in einem hohen Glascylinder befanden, der Luft bestimmte Zeit aussetzte, indem er den Wattepfropf erst

---

[1]) Annuaire de l'observatoire de Montsouris, besonders für die Jahre 1879 und 1885.

[2]) Mittheilungen aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. I, 1881, S. 32.

an Ort und Stelle abnahm und nach bestimmter Zeit wieder aufsetzte. Die Keime konnten sich jetzt, wenn sie entwicklungsfähig waren, entwickeln.

Zum Nachweise, dass in der Luft entwicklungsfähige Keime sind, hatten andere Forscher, statt dieses spontane Absetzen der Keime aus der Luft abzuwarten, versucht die Keime der Luft direct dadurch zu entziehen, dass sie die keimbeladene Luft durch sterilisirte Flüssigkeiten leiteten und dann abwarteten, ob sich in diesen Lösungen Entwicklung zeigte. So verfuhr zuerst 1855 Thompson, später Maddox, Cuningham, Cohn und Miflet.

Das Einsammeln der Luftkeime zu genauen Versuchen, wie wir sie jetzt anstreben, kann geschehen A) in Flüssigkeiten, und zwar a) in solchen, in denen keine directe Entwicklung der Bakterien möglich erscheint und hierzu dient uns nach Thompson's Vorgang von 1855 das Wasser und zwar jetzt selbstverständlich sterilisirtes, destillirtes Wasser; b) in Flüssigkeiten, welche unmittelbar auch zur Entwicklung der eingesammelten Keime dienen können; hierzu verwendete Cohn 1875 Normalsalzlösungen, während Miquel seit 1879 die Normalbouillon einführte; c) in Flüsigkeiten, welche bei bestimmten Temperaturen erstarren; zu diesem Zwecke hatte von Sehlen 1884 verflüssigte Agar-Agargallerte empfohlen und ich selbst hatte gleichzeitig und unabhängig von diesem Versuche 1884 bis 1885 die verflüssigte Gelatine eingeführt, um die Luftuntersuchung gleichsam in eine Wasseruntersuchung zu verwandeln; die Gelatine wurde später ganz ebenso von Kammerer und de Giacomi und von Straus und Würtz und von Carnelly und Wilton verwendet.

Zum Einsammeln der Keime lassen sich auch B) gelatinirte Lösungen im erstarrten Zustande verwenden, wie es 1881 von Koch und 1884 von Hesse geschehen ist.

Oder man verwednet C) feste, feinporige Körper, als Filter. So fingen a) Schröder und von Dusch 1854 die Luftkeime durch Baumwolle ein, ebenso verfuhr 1880 H. Buchner; b) statt der Baumwolle verwendete 1884 H. Buchner Glaswolle, ebenso 1887 P. Frankland und 1888 Uffelmann; c) Petri bediente sich zum selben Zwecke 1887 ganz feinen Sandes.

D) Man kann auch lösliche Filter verwenden, z. B. verwendete Pasteur die in Aether lösliche Schiessbaumwolle, Frankland fein gepulverten Zucker.

Die Aspiration abgemessener Luftmengen durch die Flüssigkeiten und über oder durch die festen Körper erfolgt mit einem geaichten Aspirator, welcher leicht transportabel sein muss. Nach Hesse kann man hierzu zwei in Verbindung stehende Literflaschen A und A[1], Fig. 63 verwenden. Ebenso gut ist eine kleine Handluftpumpe; Petri hat von Muenke eine bequemer zu handhabende und sicher zu aichende Luftpumpe mit schwingendem Cylinder und Zählwerk anfertigen lassen. In Laboratorien kann man sich zum Aspiriren der Wasserstrahlpumpen bedienen. Man muss dann zum Messen der Luftmengen zwischen Aspirationsflüssigkeit und Luftpumpe eine Gasuhr einschalten. Die Verbindung der einzelnen Abschnitte kann auf kleine Strecken durch sehr starken Gummischlauch geschehen, während auf längeren Strecken Bleirohr verwendet werden muss. Bei sehr grossem Widerstande des Einsammlungsmaterials der Keime, also bei Sand, Glaswolle, Baumwolle, muss der Aspirationsdruck natürlich stärker sein als bei dem einfachen Ueberleiten oder als bei dem Durchleiten durch Flüssigkeiten.

Unter Berücksichtigung dieser Momente und der bei den Wasser- und Bodenuntersuchungen bereits besprochenen Gesichtspunkte für die Methode im Allgemeinen ergiebt sich eine gewisse Klassificirung der bis jetzt angegebenen Methoden zur quantitativen Analyse der entwicklungsfähigen Luftkeime.

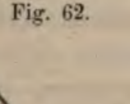
I. Die Luftkeime werden als solche eingesammelt und ohne weitere Trennung zur Entwicklung gebracht.

In etwas unbequemer Weise wird dies nach einem Verfahren von Miquel[1]) erreicht. Er verwendet hierzu den Apparat Fig. 62. Im Verlaufe einer Glasröhre a—f wird eine Kugel b von ca. 50 ccm Inhalt geblasen, darauf das eine Ende s-förmig gekrümmt, während das andere f gerade bleibt oder nur eine leichte Biegung erhält. In diesen Theil der Röhre werden etwas von einander entfernt zwei

[1]) Bulletin de la Société chimique de Paris 1878, Bd. 29, S. 397; Les Organismes etc. 1883, S. 138 und 175.

Pfröpfe von Asbest oder Glaswolle, c und d, eingebracht und zwischen beiden die Röhre ausgezogen. Der Apparat wird durch trockene Hitze sterilisirt, dann mit ca. 20 ccm der Nährlösung gefüllt, indem das Ende a in dieselbe eingetaucht und bei f gesaugt wird; durch Neigen des Apparates wird dann die Spitze a getrocknet und vor der Flamme zugeschmolzen und die Lösung im Apparat durch Dampf sterilisirt. Zum Gebrauche wird der Apparat derart befestigt, dass der Schenkel c d mit dem Horizonte einen Winkel von ca. 25 Graden bildet und die Spitze a nach oben steht. Das Ende f wird durch Kautschukschläuche mit einem Aspirator verbunden, dann wird das zugeschmolzene Ende a noch einmal erhitzt und mit glühender Zange abgebrochen und darauf der Aspirator in Gang gesetzt. Nach Abbrechen des Versuches wird die Spitze a wieder zugeschmolzen und durch heftiges Blasen am Ende f der Pfropf c, der vielleicht noch einige Keime enthält, in die Flüssigkeit getrieben, dann wird durch Senken des Apparates die Flüssigkeit bis zur Spitze a getrieben, so dass alle Keime zwischen a und d in die Flüssigkeit kommen. Man lässt durch eine grössere Zahl solcher Kölbchen bestimmte und gleiche Volumina Luft gehen, z. B. 3 Liter, so dass bei 50 Kölbchen 150 Liter Luft in toto untersucht werden, und wiederholt dies unter verschiedenen Aussenbedingungen, welche aber unter allen Umständen derart variirt sein müssen, dass ein Theil der Kölbchen nicht inficirt ist. Es ist unmöglich zu erkennen, ob die zur Entwicklung gelangten Organismen nur einem Keime entstammen oder einer Anhäufung solcher Keime, ob sie einer einzigen Art angehören oder ob nur die eine Art deshalb zur Entwicklung gekommen ist, weil die Bedingungen für dieselbe günstiger als für andere waren. Man erfährt durch dieses ältere Verfahren von **Miquel** streng genommen nicht, wie viel Keime ein bestimmtes Luftvolumen hat, sondern vielmehr wie viel Luft zu

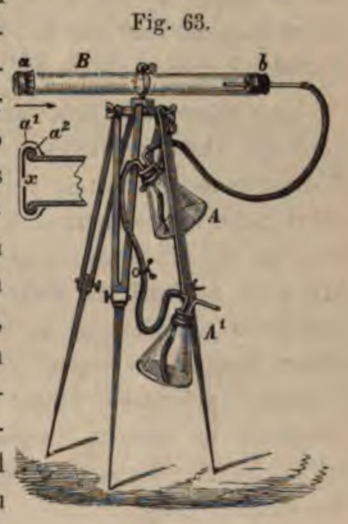
Fig. 62.




verwenden ist, um überhaupt eine Entwicklung zu erhalten. Das Verfahren fractionirt die Luft, aber nicht die keimhaltige Waschflüssigkeit.

Viel bequemer und für diesen Fall wohl auch am zuverlässigsten wird der Zweck nach der Methode von W. Hesse[1]) erreicht. Die Glasröhre B, Fig. 63, besitzt eine Länge von 70 cm und einen Durchmesser von 3,5 cm. Das Ende a wird mit einer mit centralem, runden Ausschnitte x versehenen, straff schliessenden Gummikappe a² verschlossen und über diese eine zweite ebensolche Kappe a¹ gezogen, welche aber keinen Ausschnitt besitzt und deshalb nach aussen vollständig abschliesst. Das Ende b wird mit einem fest schliessenden Gummipfropfe versehen, in dessen centraler Durchbohrung ein ca. 1 cm weites, 10 cm langes Gasrohr steckt, dessen freies Ende mit den Aspiratoren A, A¹ verbunden wird. In dieses Gasrohr werden zwei Wattepfröpfe eingepresst, von denen einer mehr central liegt, während der andere nach innen zu etwas in das Lumen der Röhre hineinragt.

Fig. 63.



Unter Entfernen des Gummipfropfs füllt man 50 ccm sterilisirte 10 %ige Nährgelatine ein, verschliesst das Ende wieder und setzt die Röhre mit Gelatine noch einmal 1 bis 2 Stunden den heissen Dämpfen aus. Nachdem die Röhre soweit abgekühlt ist, dass man sie gut halten kann, kleidet man die ganze Innenfläche der Röhre B mit einer feinen Schicht Gelatine aus, während der Boden, auf dem sich die Keime fast ausschliesslich ansiedeln, mit der grösseren Menge Gelatine bekleidet wird.

Zu diesem Zwecke kühlt man die Röhre unter der Wasserleitung ab, indem man sie in horizontaler Lage in ihrer ganzen Länge suc-

[1]) Mittheilungen aus dem K. Gesundheitsamte 1884, II, S. 182; D. med. Wochenschrift 1884, No. 2 und 51; Zeitschrift f. Hygiene 1888, IV, S. 19.

cessive unter die Leitung bringt und sie dabei schnell um ihre Axe dreht. Ist die Gelatine nur noch ganz zähflüssig, so hört man plötzlich mit dem Drehen auf und bewegt sie nur noch horizontal; dadurch entsteht an einer Stelle in der ganzen Länge eine etwas stärkere Schicht, welche beim Aufspannen auf das Gestell als Bodenschicht nach unten kommt.

An der Beobachtungsstelle nimmt man die äussere, undurchbohrte Kappe a^1 bei a ab, setzt den Aspirator in Thätigkeit und saugt langsam Luft durch. Nach Abbrechen des Versuches wird die Kappe a^1 wieder aufgesetzt.

Als allgemeines Resultat ergab sich, dass die Bakterien sich am vorderen Theile reichlicher entwickeln, während die Mehrzahl der Pilzsporen weiter innen in der Röhre zur Entwicklung gelangte. Dies rührt nicht etwa daher, dass die Bakterienkeime an sich schwerer sind als die Pilzkeime, sondern daher, dass die letzteren mehr isolirt sind, während die Bakterien gewöhnlich zu mehreren Einzelindividuen verklebt und an Staubpartikelchen angeklebt und dadurch schwerer sind. Es ergiebt sich aber weiter hieraus, dass bei diesem Verfahren prinzipiell darauf verzichtet wird, die einzelnen Keime möglichst zu isoliren. Ausserdem ist zu beachten, dass ein Auffallen trockner Keime auf die Oberfläche noch keine Garantie für Auswachsen giebt.

II. Die Luftkeime werden so eingesammelt, dass sie durch Schütteln möglichst in die einzelnen entwicklungsfähigen Keime getrennt werden können. Dies kann sowohl in Flüssigkeiten, als in gelatinirenden Medien geschehen und die Methoden müssen zum Theil combinirt werden. Um ganz mit Flüssigkeiten zu arbeiten, könnte man den Apparat von Miquel, Fig. 62, in etwas anderer Weise benützen. Man lässt nicht kleinere, fractionirte Volumina Luft durch viele solche Apparate gehen, sondern man saugt ein grössereres Volumen Luft durch einen solchen Apparat. Durch Blasen an f treibt man den oft noch Keime enthaltenden Controllpfropf c in die Flüssigkeit b und mischt nunmehr die Flüssigkeit energisch um die Keime gleichmässig in derselben zu vertheilen. Darauf vertheilt man diese keimhaltige Flüssigkeit in

Gläser mit sterilisirter Bouillon. Miquel[1]) selbst hat später dieses Verfahren in folgender Weise verbessert. Der Kolben A Fig. 64 hat eine bis auf den Boden reichende Röhre R, auf welcher ein Helm H aufgeschliffen ist, der einen mit Watte, Asbest oder Glaswolle verschlossenen Hals, a s, hat. Eine seitliche Röhre A s p wird mit dem Aspirator verbunden und trägt einen äusseren Wattepfropf w zum Schutze gegen die Aussenluft und einen inneren Wattepfropf w; zwischen beiden Wattepfröpfen wird das Glasrohr etwas ausgezogen, was in der Zeichnung nicht richtig wiedergegeben ist. Ein zweites seitliches Glasrohr ist mit einer Gummiverbindung k mit dem kapillar ausgezogenen und zugeschmolzenen Glasrohr B verbunden. Das Sterilisiren des Apparates und des zum Einsammeln der Keime dienenden destillirten Wassers g geschieht in der bekannten Weise. Eine Modification haben Kienn und Aldibbert[2]) angegeben.

Fig. 64.



Zum Gebrauche wird A s p an Ort und Stelle der Luftentnahme mit dem Aspirator verbunden, dann wird der Helm H abgenommen, so dass die Luft bei o durch die Flüssigkeit g passiren muss. Nach Beendigung des Versuches wird der Helm H wieder aufgesetzt, dann lässt man durch Blasen an A s p Waschflüssigkeit in R aufsteigen, um auf diese Weise die an den Wandungen des Glasrohres R hängengebliebenen Keime in die Waschflüssigkeit zu bringen. Darauf treibt man durch stärkeres Blasen an A s p den inneren Wattepfropf w, welcher Keime enthalten könnte, in die Waschflüssigkeit g und schüttelt nunmehr die Keime in der Flüssigkeit aus. Hierauf wird die Kapillare B noch einmal durch eine Flamme gezogen, abgebrochen und dann wird durch Blasen am Ende A sp die Flüssigkeit durch die Kapillare B in eine grössere Zahl Kölbchen mit sterili-

1) Annuaire pour l'an 1886; Annales de Mikrographie I, No. 4.

2) Revue d'hygiène 1888, X, No. 9.

sirter Bouillon vertheilt. Bei diesem Einsammeln der Keime durch sterilisirtes Wasser wird die Filtrationsfähigkeit der Watte mit verwerthet und die Aspiration muss so geregelt werden, dass nach dem Mischen und Eintragen der Einheiten der Waschflüssigkeit in die Bouillon von den 40 bis 50 Kölbchen Bouillon 15 bis 25 % steril bleiben.

Will man ohne Mitverwendung eines Wattepfropfs mit den Flüssigkeiten alle Keime einsammeln, so reichen nach Emmerich[1]) die einfachen Apparate nicht aus, weil die keimhaltigen Luftblasen mit der Waschflüssigkeit nicht innig und lange genug in Berührung kommen. Um diesen Uebelstand zu beseitigen, verwendet Emmerich den Apparat Fig. 65. Ein birnförmiges Gefäss communicirt durch eine feine Oeffnung mit einer 70 bis 80 cm langen Glasröhre, welche in etwa 7 sanft ansteigenden parallelen Windungen zu einer Glaskugel führt. Der Apparat wird durch trockene Hitze sterilisirt, dann mit 20 bis 25 ccm Nährlösung beschickt, mit sterilisirten Wattepfröpfen geschlossen und dann die Lösung durch Dampf sterilisirt. Der Aspirator wird mit der Kugel verbunden, deren Wattepfropf nicht abgenommen wird, während der Wattepfropf der Birne, bei der die Luft eintritt, am Orte der Entnahme entfernt und nach Abbrechen des Versuchs wieder aufgesetzt wird. Während der Aspiration geht die Luft in feinen Bläschen von der Eingangsöffnung aus auf langem Wege durch die Spirale, so dass sie in innigen Contact mit der Lösung kommt und ihre Keime an dieselbe abgiebt.

Fig. 65.



Die Flüssigkeit, welche die Keime aus der Luft aufgenommen hat, wird zur Trennung in die einzelnen Keime gründlich geschüttelt, und gehörig gemischt, um die Keime möglichst gleichmässig in der Flüssigkeit zu vertheilen. Erwartet man relativ wenig Keime, so kann man die 20 ccm Lösung wie bei dem Verfahren von Miquel direct in 40 bis 50 Kölbchen vertheilen.

Vermuthet man viel Organismen in der Waschflüssigkeit, so

---

[1]) Archiv für Hygiene 1883. I, S. 169.

muss man die Verdünnung weiter treiben. Man bringt in der Regel die Flüssigkeit aus dem Kölbchen von Miquel oder Emmerich in einen, eine bestimmte Menge sterilisirtes, destillirtes Wasser enthaltenden Pasteur'schen Kolben und fractionirt nach Vertheilen der Keime erst diese Mischung in Bouillonkölbchen. Für diesen Fall eignet sich gelegentlich einmal die Versuchsanordnung von Fol, Fig. 37, S. 317. Bei dem Apparate von Miquel, Fig. 62, bringt man über f einen Kautschukschlauch mit Klemme und bringt die vorher noch einmal erwärmte Spitze a nach dem Abkühlen in den Kautschukschlauch der Klemme k der Fig. 37 (2). Bei dem Apparate von Emmerich, Fig. 65 bringt man über das birnförmige Gefäss einen Kautschukschlauch mit Klemme und führt nach Entfernung des Wattepfropfs die Röhre der Kugel in den Kautschukschlauch der Klemme k, Fig. 37 (2). Das Gefäss b der Versuchsanordnung von Fol, Fig. 37 (2), wird also ersetzt durch den Ballon von Miquel oder Emmerich.

In neuerer Zeit haben Straus und Würtz[1]) ermittelt, dass, wenn man auf die Waschflüssigkeit einen Tropfen sterilisirtes Oel bringt, man auch bei einfachem Durchleiten durch die Lösungen die Luft schnell durchsaugen kann, weil das Oel ein starkes Aufschäumen verhindert.

Die Vortheile des Auswaschens der Luft durch Flüssigkeiten und des Isolirens der Keime durch gelatinirende Substanzen suchten 1884 v. Sehlen[2]) und ich[3]) gleichzeitig zu erreichen, indem v. Sehlen die Luft durch verflüssigte und bei 40° flüssig gehaltenes Agar leitete, während ich hierzu bei 30 bis 37° flüssig gehaltene Gelatine anwendete.

Diese sehr bequeme Methode führe ich seit einiger Zeit[4]) in folgender, wesentlich verbesserter Weise aus, Fig. 66. Ein Reagirglas R erhält den aufgeschliffenen Pasteur'schen Verschluss H. Der Helm H ist derart geschliffen, dass dessen Hals etwa den

1) Annales de l'Institut Pasteur 1888, II, S. 171.
2) Fortschritte der Medicin 1884, No. 18.
3) 1. Auflage, S. 167.
4) 3. Aufl. 1886, S. 239.

Durchmesser des Glases selbst besitzt; in denselben presst man den Kautschukpfropf G mit doppelter Durchbohrung. In die eine Durchbohrung kommt eine rechtwinklig gebogene Röhre As, welche dicht unter dem Pfropfe endigt, während in die andere eine rechtwinklig gebogene Glasröhre L kommt, welche bis auf den Boden des Reagirglases bei o reicht; die nach aussen kommenden Enden dieser Glasröhren sind mit Watte verschlossen. Diese Gläser werden bis etwa zu einem Drittel oder zur Hälfte mit sterilisirter Nährgelatine oder Agar gefüllt und der Vorsicht halber noch einmal aufgekocht. Nährgelatine wird dann während des Versuchs durch Einsetzen in ein Bad von ca. 35°, die etwas unbequemere Agarlösung durch 40 bis 42° flüssig gehalten, so dass sie wie eine Lösung wirken. Dann wird der Aspirator mit der kurzen Glasröhre As verbunden und der Wattepfropf vom freien Ende der in die Gelatine eintauchenden Glasröhre L entfernt, so dass die Luftblasen die Flüssigkeit g von o aus durchsetzen; nach Abbrechen des Versuches wird der Wattepfropf bei L wieder aufgesetzt. Den langen Glasschenkel zieht man dann aus der flüssigen Gelatine heraus, so dass die untere Oeffnung bei x über der Gelatine steht, damit die Gelatine in der Röhre L nicht verloren geht. Dann mischt und vertheilt man durch Schütteln die Keime so gut als möglich. Inzwischen werden Glasplatten in einem vorher angefeuchteten Kasten fertig gestellt und erst in diesem Kasten der Helm abgenommen und die Gelatine oder das Agar auf die Platten ausgegossen. Während man ohne den helmartigen Verschluss immer der Gefahr einer Verunreinigung am Rande des Reagirglases ausgesetzt ist, wird bei dieser Art des Vorgehens der Rand r des Reagirglases während das ganzen Versuches überhaupt nicht berührt, so dass jede Gefahr von dieser Seite wegfällt. Operirt man in dem feuchten Kasten, so wird eine in diesem Falle sehr störende Luftinfection selbst bei Anwendung von Platten fast sicher vermieden. Meist ist es aber wünschenswerth auch diese Möglichkeit ganz zu beseitigen, man giesst dann die flüssige Gelatine unter

Fig. 66.



Abheben des Helmes und schnellem Oeffnen des Watteverschlusses in ein flaches Kölbchen und lässt dieselbe mit ihren Luftkeimen hierin erstarren. Will man ein Rollröhrchen anlegen, so nimmt man den Helm ab und setzt auf die Oeffnung des Reagirglases R bei r einen vorher präparirten Wattepfropf. Auf diese Weise wird eine Luftinfection fast unmöglich.

Kammerer und de Giacomi[1]) haben dasselbe Prinzip bei einigen anderen Apparaten angewendet und ebenso haben Straus und Würtz l. c. sich desselben Prinzips bedient, wobei sie ermittelten, dass viele Vorwürfe, welche dieser Methode gemacht wurden, unbegründet sind. Dieselben bedienen sich eines kleinen Apparates der Form Fig. 67. Derselbe besteht aus einem Glastubus A, welcher die während des Versuches flüssig zu haltende und mit einem Tropfen Oel bedeckte Nährgelatine aufnimmt. Die zum Durchsaugen der Luft bestimmte Röhre B ist bei C in den Hals des Gefässes A eingeschliffen. Zum Beginne des Versuches wird der Wattepfropf w^1 entfernt, der nach Beendigung des Versuches sofort wieder aufgesetzt wird. Die Aspiration erfolgt an der Röhre D, welche eingeschnürt ist und nach aussen vor der Einschnürung den Wattepfropf w^2 trägt, während noch innen der Wattepfropf w^3 sitzt. Nach Abbrechen des Versuches kann man durch leichtes Blasen an der Röhre D die flüssige Gelatine in der Röhre B aufsteigen lassen, um die dort vorhandenen Keime in die Gelatine überzuführen. Durch stärkeres Blasen an D wird schliesslich auch der Wattepfropf w^3, welcher noch einige Keime enthalten könnte, in die Gelatine getrieben. Dann werden durch Schütteln die Keime in der Gelatine vertheilt
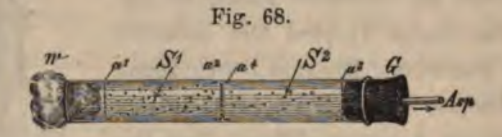
Fig. 67.

[1]) Archiv f. experimentelle Pathologie und Pharmakologie 1886, Bd. 21, S. 318.

und diese in der Röhre A nach Art eines Rollröhrchens zum Erstarren gebracht. Man kann auch die Gelatine auf Platten oder in ein Kölbchen überführen und dort erstarren lassen. Bei meinem einfacheren und leicht zu improvisirenden Apparate kann man das Tröpfchen Oel und in der Röhre As einen inneren Watteverschluss eben so gut anbringen.

P. F. Frankland[1]) und Petri[2]) haben unabhängig von einander das Auffangen der Keime durch poröse feste Körper verwendet, indem Frankland Glaspulver, Glaswolle und Zucker, Petri Baumwolle, Asbest, Gyps und feinen Sand versuchte. Am meisten dürfte sich wohl eine Verbindung von ganz feinem Glaspulver oder Sand mit etwas Glaswolle oder Watte empfehlen. Man nimmt eine ca. 8 bis 10 cm lange Glasröhre vom Durchmesser eines Reagirglases Fig. 68. An der zum Eintritt der Luft bestimmten Stelle wird ein Wattepfropf

Fig. 68.



w angebracht, welcher zu dem Versuche abgenommen und nach Abbrechen desselben zum Transport der Röhre wieder aufgesetzt wird. Das mit dem Aspirator zu verbindende Ende trägt einen Gummipfropf G, der in der centralen Durchbohrung ein kurzes Glasrohr Asp trägt.

Die Filter S^1 und S^2 sind je 3 cm lang; das 2. Filter dient als Controlle, doch gelangen bei richtiger Herstellung wohl kaum einmal Keime in dasselbe und die 3 cm lange feinporige Filterschicht S^1 genügt meist vollständig. Man kann als Filter auch eine feste Lage Baumwolle, Glaswolle oder Asbest benutzen. Will man gepulverte Glaswolle, feinen Glasstaub oder Sand benutzen, so bringt man nach Petri Scheiben von feiner Drahtgaze a^1, a^2, a^3 und a^4 als Stützen für den Sand ein, so dass erst a^2 eingebracht wird; dann

[1]) Philosophical Transactions of the Royal Society 1887, Vol. 178. S. 113; Zeitschrift f. Hygiene 1887, III, S. 287.

[2]) Zeitschrift für Hygiene 1887, III, S. 1.

wird der Sand S^1 eingefüllt und die Drahtgaze a^1 als Schluss aufgesetzt. Ebenso bringt man auf der anderen Seite zuerst a^4, dann den Sand S^2 und darauf das Drahtgewebe a^3 ein. Statt der Drahtgazestützen kann auch eine dichte Lage Glaswolle oder Baumwolle dienen. Die fertigen Filter werden durch trockene Hitze sterilisirt.

Nach Beendigung der Aspiration bringen Frankland und Petri das Filtermaterial mit seinen Keimen in verflüssigte Gelatine, welche sich in Kolben oder flachen Schalen befindet und lassen sie dort erstarren. Uffelmann[1]) bringt den Pfropf von Glaswolle in eine geringe Menge sterilisirtes, destillirtes Wasser, schüttelt ihn in dem Wasser gut aus und giebt dann erst das keimhaltige Wasser in verflüssigte Gelatine.

Die Combination der Plattenmethode mit der Verdünnungsmethode hatte ich für die Luftuntersuchung schon 1885 in der ersten Auflage, S. 165 empfohlen und Miquel[2]) hält dieselbe gleichfalls für sehr geeignet. Man kann ganz allgemein die zum Einsammeln der Keime dienende Waschflüssigkeit unmittelbar in mehrere Kölbchen mit flüssiger Gelatine vertheilen oder aber das feste Filtermaterial erst mit Wasser ausschütteln und dann erst die Waschflüssigkeit plus dem darin suspendirten festen Material in einige Kölbchen mit flüssiger Gelatine vertheilen.

Am bequemsten von allen Methoden und dadurch zur schnellen und relativ guten Orientirung geeignet ist das directe Arbeiten in verflüssigter Gelatine nach dem von von Sehlen und mir angegebenen Verfahren und nach der Modification von Straus und Würtz. Am exactesten scheint es mir, die Keime nach Petri und Frankland mit Glaswolle und Glasstaub resp. Sand aufzufangen, dieses Materia nach Uffelmann in sterilisirtem Wasser auszuschütteln und dann erst Waschwasser und Filtermaterial in mehrere Kölbchen mit verflüssigter Gelatine einzutragen.

Das Arbeiten ganz in Flüssigkeiten nach Miquel ist viel unbequemer, so dass es trotz einiger besserer Resultate wohl mehr als Ergänzung dienen dürfte.

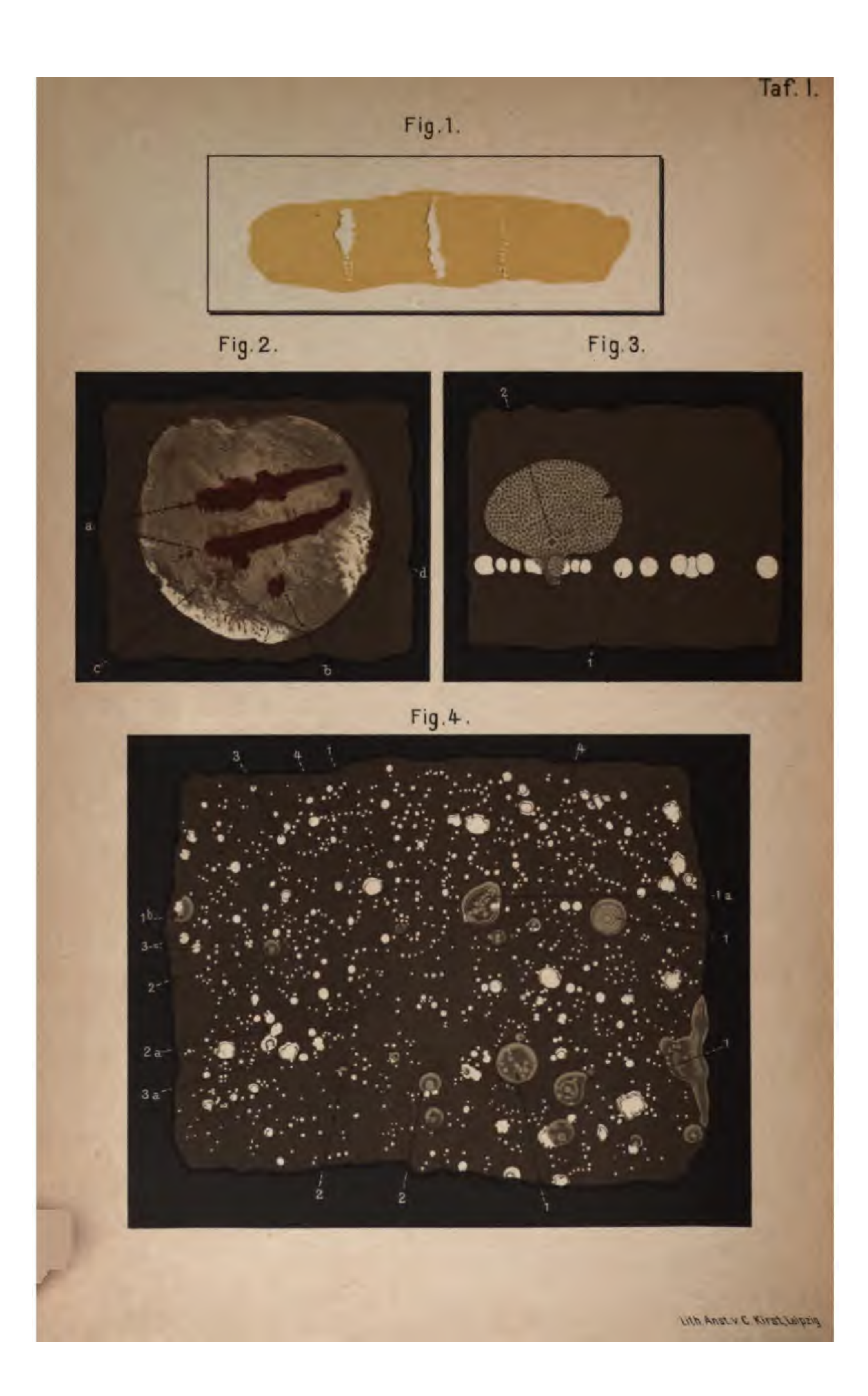
---

[1]) Archiv f. Hygiene 1888, Bd. VIII, S. 262.

[2]) Annuaire pour l'an 1888.

Da obligate Parasiten durch keine dieser Methoden sicher ermittelt werden, muss man ev. den Staub, z. B. eines Krankenzimmers, direct mit etwas sterilisirter 0,5 % Kochsalzlösung aufschwemmen und dann diese Suspension Thieren beibringen. Bei Verdacht auf Tuberkulose bringt man beispielsweise das Material Meerschweinchen in die Peritonealhöhle; will man etwa Haderstaub auf Bakterien des malignen Oedems oder auf Milzbrand prüfen, so bringt man die Suspension in eine Hauttasche.

Alphabetisches Sach-Register.



Taf. I.
Fig. 1.
Fig. 2.
Fig. 3.
Fig. 4.
Lith. Anst. v. C. Kirst, Leipzig


Fig. 1.
Fig. 2.
Fig. 3.
Fig. 4.

Erklärung der Abbildungen.

Tafel I.

Fig. 1. Objectträgerkultur von Milchsäurebakterien im durchfallenden Lichte in natürlicher Grösse; Text S. 332. Die kleinen weissen Punkte zeigen das isolirte Wachsthum im Impfstriche im Inneren der Gelatine, während die grösseren sich berührenden kreisförmig begrenzten Flecken und breiten Streifen das Oberflächenwachsthum auf der Gelatine erkennen lassen.

Fig. 2. Kartoffelkultur; Text S. 278 und 321. In den Impfstrichen a haben sich die Bakterien, m. prodigiosus, zu breiten Streifen ausgebildet und nur wenige isolirte Colonien sind noch deutlich. Bei b hat sich von einem Impfstriche aus eine grössere kreisförmige Colonie entwickelt. Bei c und d wächst von der Schale her der sog. Kartoffelbacillus auf die Scheibe und berührt bei d die Reinkultur.

Fig. 3. Theil des Impfstriches von b. lactis, der Fig. 1. bei ca. 20facher Vergrösserung. Die Colonien 1 im Inneren der Gelatine sind meist noch gut isolirt. Die aus einem Luftkeime entstandene Colonie 2 ist an einer Stelle über den Impfstrich hinübergewachsen.

Fig. 4. Plattenkultur in natürlicher Grösse; Text S. 336. Die Colonien sind bei Zimmertemperatur aus 1 ccm Wasser gewachsen. Die Colonien 1 verflüssigen die Gelatine schnell; die Colonien 2 verflüssigen langsam trichterförmig; die Kokkenart 3 wächst an der Oberfläche in Form porzellanartig glänzender Köpfchen und die Colonien 4 zeigen im Inneren der Gelatine ein langsames Wachsthum, so dass diese Differenzen mit Leichtigkeit gestatten, trotz der grossen Menge der Colonien mindestens 4 Arten zu trennen. Bei vielen der sich schnell ausbreitenden Colonien 1 sieht man überwucherte andersartige Colonien durchschimmern; bei 1 a berühren sich zwei Colonien der Art 1; bei 1 b hat eine Colonie von 1 eine Colonie von 3 berührt. Bei 2 a berührt sich eine Colonie von 2 mit einer von 3; bei 3 a haben sich Colonien von 3 und 4 vereinigt.

Fig. 5.

Fig. 6.

c
b
a

Fig 7.

b'
a
b

Fig. 8.

a'
c
b'
b
a

Fig. 9.



Fig. 10.



Fig. 11.



Lith. Anst. v. C. Kirst, Leipzig.

Erklärung der Abbildungen.

Tafel II.

Fig. 5. Stichkultur in Gelatine, Text S. 277 u. 281. Kokken der Pneumonie; an der Oberfläche haben sich stark prominirende glänzende weisse Köpfchen gebildet, während im Impfstiche nach unten zu noch isolirte Colonien sich finden. Die Gelatine hat in den oberen Parthien einen bräunlichen Ton angenommen.

Fig. 6. Stichkultur eines stinkende Eiweissfäulniss verursachenden Bacillus. Im Impfstiche hat sich eine moosartige, verzweigte Zoogloea a ausgebildet. Die Verflüssigung schreitet schichtenweise vor unter Trübung der verflüssigten Gelatine. An der Grenze zwischen fester und flüssiger Gelatine findet sich bei b eine Schicht von Bakterien, während sich an der Oberfläche bei c eine feine Decke von Bacillen bildet.

Die Figuren 1 bis 6 sind unter Zugrundelegung von Photogrammen gegeben, so dass die Objectivität der Photographie mit dem natürlichen Aussehen möglichst treu wiedergegeben ist.

Fig. 7. und 8. Reinkulturen von Tuberkelbacillen auf erstarrtem Blutserum nach Koch; Text S. 277 und 323. Das Serum ist in den untersten dicken Schichten bei a nur eben durchscheinend, in den oberen dünnen Schichten bei a vollständig klar; das Condensationswasser hat sich im unteren Theile zwischen b und b[1] angesammelt. In der Fig. 7. der Profilansicht, sieht man wie die Kultur bei Berührung der Flüssigkeit bei b[1] auf diese in Form eines Häutchens übergreift.

Fig. 9. Tuberkulöses Sputum; Text S. 124. Die Tuberkelbacillen blau, die Kerne und übrigen Bakterien, Kokken in Ketten und Tetraden und Stäbchen, braun.

Fig. 10. Sporenfärbung; Text S. 148. Die Sporen der Milzbrandbacillen roth, die relativ jungen Stäbchen kräftig, die älteren Fäden schwach blau gefärbt.

Fig. 11. Doppelfärbung eines Schnittes; Text S. 181. Miliartuberkulose. Riesenzelle mit blau gefärbten Tuberkelbacillen.

